Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. H.-W. Altmann

UNTERSUCHUNGEN ZUM PROTEINSTOFFWECHSEL DER TUBULUS-EPITHELIEN DER RATTENNIERE BEI HEREDITÄREM DIABETES INSIPIDUS HYPOTHALAMICUS

Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-l-Phenylalanin

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Wilhelm Apetz

aus Würzburg

Würzburg, den 8. Oktober 1980

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. H.-W. Altmann

UNTERSUCHUNGEN ZUM PROTEINSTOFFWECHSEL DER TUBULUS-EPITHELIEN DER RATTENNIERE BEI HEREDITÄREM DIABETES INSIPIDUS HYPOTHALAMICUS

Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-l-Phenylalanin

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Wilhelm Apetz

aus Würzburg

Würzburg, den 8. Oktober 1980

Referent:	Prof.Dr. med. W.-D. Heine
Korreferent:	Prof.Dr. med. H.-W. Altmann
Dekan:	Prof.Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Fragestellung	1
B. Material und Methode	5
I. Tiermaterial	5
II. Versuchsdurchführung	6
III. Aktivitätsapplikation	7
IV. Aufarbeiten des Materials	8
1. Herstellung der Autoradiogramme	8
2. Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate	8
3. Aktivitätsmessungen	9
V. Auswertung der Autoradiogramme	10
VI. Berechnungen	17
C. Ergebnisse	20
I. Vorbemerkungen	20
II. Beschreibung der Tubuli mit vermehrten Cytoplasmaeinschlüssen und Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	22
III. Die mittlere Silberkornzahl pro Kern und die mittlere Kerngröße	33
IV. Die korrigierte Tritiumaktivität über den verschiedenen Zell- und Tubulusstrukturen	36
V. Die mittlere Aktivität über dem Gesamtnephron	41
VI. Mittelwertvergleich	43
VII. Vergleich der Inkorporationsraten über Cytoplasma und Kernen	46
VIII. Die mittlere Kernzahl pro Blickfeld	47
IX. Aktivitätsmessungen	48
D. Diskussion	52
I. Zur Aussagekraft der autoradiographischen Befunde nach Injektion von ^{3}H-l-Phenylalanin	52
II. Die caryoplasmatische Aktivitätsinkorporation	56
III. Die cytoplasmatische Aktivitätsinkorporation	58
IV. Zum Einfluß der Versuche auf den Proteinstoffwechsel der Gesamtzelle	60
V. Der Vergleich der verschiedenen Nephronabschnitte	64
1. Proximaler Tubulus und HENLE-sche Schleife	64
2. Der proximale Tubulus mit und ohne Vakuolen	65
VI. Die Aktivität der Gesamtniere	70
E. Zusammenfassung	72
F. Tabellarischer Anhang	I
G. Literaturverzeichnis	VIII

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

		Seite
Nr. 1	Zonale Einteilung der Niere nach Mc FARLANE	10
Nr. 2	Schematische Darstellung des Nephrons	13
Nr. 3	Lage der Zählquadrate im Cytoplasma	15
Nr. 4	Dilatierte Sammelrohre mit Eiweißzylindern	21
Nr. 5	Normale Tubuli im Vergleich zu Tubuli mit verlorengegangener Zellorganisation bei geringer Vergrößerung	23
Nr. 6	Lysosomenüberladene Tubuli im Stratum labyrinthicum	24
Nr. 7	" Normaler " proximaler Tubulus	25
Nr. 8	Proximaler Tubulus mit starker Lysosomenbeladung	26
Nr. 9	Die HENLE-sche Schleife	27
Nr. 10	Deformierte Zellkerne im proximalen Tubulus	28
Nr. 11	Semidünnschnitt durch zwei Glomerula mit Hypertrophie des Juxtaglomerulären Apparats	29
Nr. 12	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der	30
Nr. 13	Cytoplasmaeinschlüsse in Zellen des proximalen Tubulus	31
Nr. 14	Hypertrophie des rauhen endoplasmatischen Retikulums in der Umgebung eines lysosomalen Restkörpers	

A. Einleitung und Fragestellung

Der Diabetes insipidus (D.I.) ist eine seltene Erkrankung, bei der eine teilweise oder völlige Unfähigkeit zur Wasserrückresorption im distalen Konvolut des Nephrons und im Sammelrohr der Niere vorliegt. Die Störung der Harnkonzentrierung, d.h. die Asthenurie, ist die Folge einer fehlenden ADH (Vasopressin, Adiuretin) - Wirkung. Dabei unterscheidet man die zentrale Form des Diabetes insipidus mit fehlerhafter Bildung, Speicherung oder Abgabe des ADH aus dem hypothalamisch - neurohypophysären System (= D.I. centralis od. hypothalamicus), und die renale Form, bei der trotz normalem ADH - Spiegel im Blut aufgrund einer Erfolgsorganresistenz die Wasserpermeabilität im distalen Tubulus und im Sammelrohr gestört ist (= D.I. renalis). Beide Krankheitsformen können sowohl hereditär (bzw. idiopathisch) als auch erworben (z.B. durch Tumoren, Entzündungen, Traumen im Hypothalamus - Hypophysenbereich; chronische Pyelonephritis) sein (vgl. SCHETTLER, G. 1976; SIEGENTHALER, W. 1976; BÁLINT, P. 1969). Während beim neurohypophysären Diabetes insipidus der hypotone Diuresezuwachs durch exogene ADH - Substitution beseitigt werden kann, ist die Asthenurie beim nephrogenen D.I. weder durch ADH - Gaben noch durch den Durstversuch zu beeinflussen (BUCHBORN, E. 1965).

Wie bereits angedeutet, besitzt ADH nur an den Epithelien des distalen Konvoluts und der Sammelrohre einen die Wasserpermeabilität steigernden Effekt. Im besonders gut wasserdurchlässigen proximalen Tubulus werden nämlich unabhängig davon, ob sich die Niere im Zustand der Wasserdiurese oder Antidiurese befindet, etwa 7o % des Glomerulumfiltrats resorbiert. An ihm ist durch ADH - Gabe keine Steigerung und bei ADH - Mangel keine Verminderung der Wasserdurchlässigkeit zu messen (ULLRICH, K.J., RUMRICH, G., FUCHS, G. 1964; DEETJEN, P. 1976). Auch der aufsteigende Teil der HENLE-schen Schleife ist durch ADH nicht zu beeinflussen. Die verminderte Volumenresorption in

Wasserdiurese ist daher allein eine Funktion des distalen Nephronabschnittes (DEETJEN, P. 1976; SIEGENTHALER, W. 1976). Der eigentliche Wirkungsmechanismus des Adiuretin ist noch nicht endgültig geklärt. So wird einerseits eine direkte Bindung an Rezeptoren der Zellmembran mit konsekutiver Neuorientierung der Membranstruktur und Erweiterung der Poren vermutet (LEAF, A. 1967; DICKER, S.E., ELLIOTT, A.B. 197o; BÖRNER, E. 1974; Lit. bei DEETJEN, P. und BOYLAN, J.W. 1976), während andere Autoren die ADH - Wirkung in einer Steigerung der Hyaluronidaseproduktion der Tubuluszellen sehen, wodurch die interzelluläre Mukopolysaccharide depolymerisiert werden und so die Wasserpermeabilität erhöht werden soll (JANCSO 1955 in BÁLINT, P. 1969). Nach einer anderen Theorie soll ADH die Umwandlung von ATP in zyklisches Adenosin 3', 5' - monophosphat im Sinne eines " second messenger " bewirken (ORLOFF, J., HANDLER, J.S. 1964; BUCHBORN, E. 1965; DEETJEN, P. 1976).

Aus den oben geschilderten pathophysiologischen Grundlagen lassen sich die Symptome des Diabetes insipidus leicht ableiten. Kennzeichen dieser Krankheit ist die Asthenurie, d.h. das Unvermögen, den Urin bei Hydropenie nennenswert über die minimale Harnkonzentration bei Wasserdiurese zu konzentrieren (SIEGENTHALER, W. 1976), mit konsekutiver Polyurie, zwanghafter Polydipsie, Hypernatriämie und Hyperchlorämie. Die Kranken befinden sich in einem ständigen Durstzustand mit der Gefahr der Hypovolämie und Exsikkose.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beschränken sich auf den Diabetes insipidus centralis (hypothalamicus) und hierbei auf die hereditäre Form, welche in beispielhafter Weise bei den Brattleboro - Ratten vom Long Evans - Stamm zu finden ist. Bei der Sektion solcher Tiere fiel nebem dem hypertrophierten Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis auf, daß ihre Nieren im Vergleich zu Normaltieren um 1/3 bis 1/2 verkleinert und

von deutlich dunkelbrauner Farbe waren. Es erschien deshalb interessant zu überprüfen, ob sich in der (zu) kleinen Niere aufgrund des exzessiven Harndurchflusses und des völligen Fehlens des Stimulus durch aktives Antidiuretisches Hormon reaktive Veränderungen im Proteinstoffwechsel des Organs speziell der Tubulusepithelzellen nachweisen lassen. Daß zur Beantwortung dieser Frage nur die Epithelzellen des proximalen Tubulus und des dicken Teils der aufsteigenden HENLE - schen Schleife herangezogen wurden, liegt vor allem in der Technik der Autoradiographie begründet, deren Auswertung durch Silberkornzählung in den anderen Tubulusabschnitten und im Sammelrohr praktisch unmöglich ist (s.u.). Es war daher von vorneherein klar, daß die Veränderungen im Eiweißstoffwechsel der untersuchten Zellen niemals direkte Folge des erhöhten Harnvolumens oder des ADH - Mangels sein konnten, da diese Tubulusabschnitte weder Angriffspunkt des ADH sind, noch den Durchfluß eines erhöhten Harnvolumens aufweisen (s.o.).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch der Frage nach einem Einfluß des oralen Antikonvulsivums Carbamazepin (Tegretal) auf die Proteinsynthese der Tubulusepithelzellen nachgegangen werden. Der antidiuretische Effekt von Carbamazepin wurde erstmals 1966 von BRAUNHOFER und ZICHA beschrieben. Für diese " Nebenwirkung " des Medikamentes gibt es prinzipiell drei mögliche Angriffspunkte (TIETZE, H.U. 1973 a) :

a) vasopressinartige Wirkung an der Niere
b) Potenzierung noch vorhandener minimaler ADH - Mengen
c) zentrale Stimulation der Produktion und/oder Sekretion von ADH, wobei die potentielle Fähigkeit zur Bildung von ADH gegeben sein muß.

Durch die Versuche von UHLRICH, E., LOESCHKE, K., EIGLER, J. (1972) und TIETZE, H.U., PÖPPEL,J. (1973) wurde die zentrale Wirkung am wahrscheinlichsten gemacht. Von allen

Autoren konnte kein direkter renaler Angriff und keine Potenzierung vorhandener ADH - Mengen nachgewiesen werden. Bei ihren Untersuchungen wurden, ebenso wie in dieser Arbeit, Ratten vom Brattleboro - Stamm verwendet. Diese leiden an hereditärem zentralen Diabetes insipidus und sind von Geburt an zur ADH - Synthese völlig unfähig. Da bei ihnen deshalb keine Änderung der Diurese und Urinosmolalität durch Carbamazepin erzielt werden kann, ist ein direkter Zusammenhang mit der Eiweißsynthese nach Verabreichung von Tegretal nicht zu vermuten.

B. M A T E R I A L und M E T H O D E

I. Tiermaterial

Die Versuche wurden an 12 Ratten vom Long Evans - Stamm durchgeführt. Zwei der Ratten waren normale Long Evans - Tiere und stellten die Kontrollgruppe dar, während die übrigen zehn Ratten zum Brattleboro - Stamm gehörten, welcher sich durch Spontanmutation aus dem Long Evans - Stamm entwickelt hat. Die Brattleboro - Ratte wurde 1961 in Vermont, U.S.A. entdeckt (VALTIN ,H., SCHROEDER, H.A., BERNISCHKE, K., SOKOL, H.W. 1962; VALTIN, H., SCHROEDER, H.A. 1964; VALTIN, H. 1967). Sie besitzt einen angeborenen autosomal rezessiv vererbten Diabetes insipidus hypothalamicus (SAUL, G.B. et al. 1968), weshalb drei Genotypen entstehen können, nämlich homocygote und heterocygote Brattleboro - Ratten sowie normale Long Evans - Tiere.

Die homocygoten Ratten sind zur ADH - Synthese völlig unfähig. Sie produzieren bis zu 8o % ihres Körpergewichtes Urin pro Tag (spez. Gew. etwa 133 mOsmol/kg H_2O) und nehmen entsprechend viel an Wasser auf. Im Vergleich zu Normaltieren sind sie untergewichtig.

Die normalen Long Evans - Ratten scheiden pro Tag etwa 3 % ihres Körpergewichtes aus, wobei die Osmolalität des Urins bei 22oo mOsmol/kg H_2O liegt.

Die Heterocygoten sind normalgewichtig. Ihre Urinausscheidung, Urinosmolalität und Trinkmenge steht zwischen den Werten der homocygoten und normalen Long Evans - Ratten (VALTIN, H. 1976; MORRIS, J.F., NORDMANN J.J., DYBALL, R.E.J. 1978).

Die für unsere Versuche verwendeten Brattleboro - Ratten waren alle homocygot. Ihr Gewicht schwankte zwischen 237 g und 3oo g. Diese Tiere, die zum Teil im Institut nachgezüchtet worden waren, waren mit Sicherheit nicht älter als sechs Monate. Das Alter der Long Evans - Ratten war nicht zu ermitteln.

Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen in Stoffwechselkäfigen (WEIGELT, O. 197o) gehalten und mit Altromin - Standardfutter ernährt, welches ihnen bei allen Versuchen immer frei zur Verfügung stand.

Die zehn Diabetes insipidus - Ratten wurden in drei Gruppen unterteilt:

1. (= Versuchsgruppe II)
   a. Zwei Tiere blieben ohne Vorbehandlung (Futter und Wasser ad libitum)
   b. Zwei Tiere ohne Vorbehandlung bekamen Carbamazepin
2. (= Versuchsgruppe III)
   a. Bei zwei Tieren wurde eine Dauerinfusion durchgeführt
   b. Zwei weiteren Tieren mit Dauerinfusion wurde Carbamazepin verabreicht
3. (= Versuchsgruppe IV)
   Zwei Tiere wurden einem Durstversuch unterzogen.

II. Versuchsdurchführung

Gruppe I : Normale Long Evans - Tiere
Die Long Evans - Kontrollgruppe erhielt Altromin und Wasser ad libitum.

Gruppe II: Diabetes insipidus - Ratten ohne Vorbehandlung
Allen vier Tieren war Wasser und Altromin ständig frei zugänglich. Zweien der Ratten wurde ein Carbamazepinhomogenisat über eine Polyäthylen - Schlundsonde im wachen Zustand appliziert. Da das Carbamazepin in Wasser so gut wie unlöslich ist, mußte es in 1 %iger Carboxymethylcellulose (CMC -) - Lösung aufgeschwemmt (5o mg Carbamazepin pro 5 ml CMC) und homogenisiert werden. Die Tiere erhielten morgens (8.oo Uhr) und abends (2o.oo Uhr) jeweils 5 mg Carbamazepin pro 1oo g Körperge-

wicht.

Gruppe III: Diabetes insipidus - Ratten mit Dauerinfusion
Die Ratten dieser Gruppe wurden über einen Schwanzvenenkatheder mit Hilfe von Infusionspumpen mit 5 %iger Glucoselösung hydriert. Die Infusionsmenge betrug in keinem Fall mehr als 1oo % des Körpergewichtes pro Tag. Die Versuche wurden solange fortgesetzt, bis als Zeichen der vollständigen Hydrierung das spontane Trinken aufgegeben wurde. Es wurde dann noch leicht weiter infundiert, um den Zustand der Hydration aufrecht zu erhalten, so daß bei einigen Tieren zum Teil erhebliche Ödeme (bes. Schnauzenödeme) auftraten. Es wurde darauf geachtet, daß die Ratten während der Einwirkungszeit des radioaktiven Prekursors (s.u.) gut hydriert waren. Die Verabreichung von Carbamazepin an zwei der Ratten erfolgte analog der Gruppe II.

Gruppe IV: Diabetes insipidus - Tiere im Durstversuch
Der bei zwei Tieren durchgeführte Durstversuch erstreckte sich über 48 Stunden.

III. Aktivitätsapplikation

Als radioaktiver Vorläufer (Prekursor) der Proteinsynthese diente Tritium - (^{3}H-) markiertes l - Phenylalanin, welches von der Firma New England Nuclear (NEN) synthetisiert wurde. Die Tiere aller Gruppen erhielten eine einmalige intraperitoneale Injektion von 1 ml unverdünntem ^{3}H - l - Phenylalanin. Die Gesamtaktivität betrug 1.o mCi, die spezifische Aktivität 4.5 Ci/mMol.

Nach einer Einwirkungsdauer von einer Stunde wurden die Ratten in leichtem Ätherrausch durch Dekapitation getötet.

IV. Aufarbeitung des Materials

1. Herstellung der Autoradiogramme

Sofort nach dem Ausbluten der Ratten wurden Teile von Niere, Leber, Herz und Gehirn für 48 Stunden in neutralem, mit Calciumcarbonat gepuffertem 1o %igen Formalin fixiert. Dann wurden die Präparate 24 Stunden gewässert und in der üblichen Weise über die aufsteigende Alkoholreihe, Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 3 - 4 µ dicke Schnitte angefertigt und entparaffiniert. Um freien, nicht in das Eiweiß inkorporierten radioaktiven Vorläufer vor der Autoradiographie mit Sicherheit aus den Schnitten zu entfernen, wurde zum Austausch der entsprechende inaktive Vorläufer in hoher Konzentration (o.5 mg/ml l-Phenylalanin) sowohl der Fixationsflüssigkeit der Organstücke, als auch den Waschlösungen der Schnitte zugesetzt.

Für die autoradiographische Technik wurde entsprechend den Beschreibungen von PELC, S.R. (1947, 1956), MAURER, W. (1959), SCHULTZE, B. (Lit., 1968), FISCHER, H.A., WERNER, G. (Lit., 1971) und AMLACHER, E. (Lit., 1974) Kodak AR 1o " stripping film " verwendet. Die Autoradiogramme wurden 1o und 3o Tage bei + 4 ^{o}C in trockener Luft exponiert. Die photographische Entwicklung und Fixation der Filme erfolgte unter strengster Konstanz der Bedingungen. Anschließend wurde eine Nachfärbung der Präparate durch die Emulsionsschicht mit Hämatoxilin und Eosin durchgeführt. Weitere, nicht der Autoradiographie unterzogene Schnitte wurden mit anderen herkömmlichen Färbeverfahren (Pearse, Ladewig, Giemsa,H.E.) behandelt.

2. Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate

Von Tieren jeder Versuchsgruppe wurde nach Tötung und Entblutung jeweils die linke Niere entnommen und Gewebe-

stücke zwei Stunden lang mit OsO_4 immersionsfixiert. Bei einer Diabetes insipidus - Ratte der Gruppe II (Wasser und Futter ad libitum) wurde zuerst in Äthernarkose eine OsO_4 - Oberflächenbetropfung der entkapselten linken Niere vorgenommen und dann Pyramiden und immersionsfixierte Rindenwürfel eingebettet.

Als Einbettungsmittel für alle elektronenmikroskopischen Präparate diente Epon, in welches die Gewebswürfel nach Waschung in Phosphatpuffer, aufsteigender Alkoholreihe und Propylenoxyd übergeführt wurden. Von diesen wurden zunächst mit dem Ultramikrotom Semidünnschnitte (o.25 - 1.5μ) angefertigt und später gezielte elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht (zur Semidünnschnitttechnik vgl. BLÜMCKE, S. und BACKMANN, R. 1966).

Weder die Semidünnschnitte, noch die elektronenmikroskopischen Präparate wurden autoradiographiert.[⊕]

3. Aktivitätsmessungen

Die Tritium - Aktivitätsmessungen sollten dazu dienen, Veränderungen der Poolverhältnisse der freien Aminosäure unter den gegebenen experimentellen Bedingungen zu erkennen und die Werte für die Niere mit den autoradiographischen Ergebnissen vergleichen zu können.

Zu diesem Zweck wurden Stücke der eingebetteten Organe (Niere, Leber und Herz) in mehrfach gewechseltem Xylol entparaffiniert und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Einwiegen wurden die Organproben von etwa 2o mg in einer Sauerstoffathmosphäre rückstandsfrei verascht und die Radioaktivität des dabei entstehenden Oxydationswassers im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (TriCarb, Modell 2425 der Firma Packard, La Grange, Illinois, U.S.A.) gemessen. Als Szintillationsmedium diente das von der Firma Packard hergestellte " Monophase TM 4o " (the single phase fluor for sample oxydizers). Die mittlere Zählausbeute betrug 12 %. Um die Vergleichbarkeit der unter-

---

[⊕] Mein besonderer Dank für seine Hilfe bei der Anfertigung und Auswertung der Semidünnschnitte und elektronenmikroskopischen Aufnahmen gilt Herrn Dr. W. Romen.

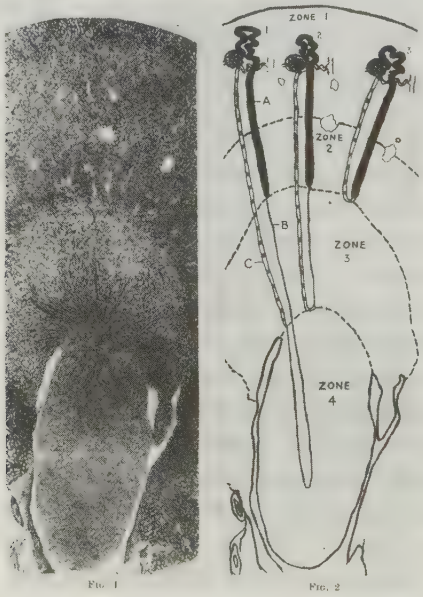
schiedlich schweren Tieren zu ermöglichen, wurde folgende rechnerische Korrektur vorgenommen:

$$\frac{\mu Ci\,(\text{gemessen Organ})^{\oplus}}{g\ (\text{Organgewicht, trocken})} \Big/ \frac{\mu Ci\,(\text{applizierte } {}^{3}H\text{-Aktivität})}{g\ (\text{Tiergewicht})}$$

V. Auswertung der Autoradiogramme

1. Zonale Einteilung der Niere

In Anlehnung an Mc FARLANE (1941) und andere Autoren (CAIN, H., FAZEKAS, S. 1962; NOLTENIUS, H., ACHENBACH, H., OEHLERT, W., SCHELLHAS, H. 1965; HEINE, W.-D. 1968) teilen wir die Niere in vier Zonen ein (vgl. Abb. 1):



Mc FARLANE, D., J. Path. Bact. 52, 19 (1941)

⊕ Die Tritiumaktivität des verbrannten Gewebestückes wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrades des Oxydationswassers und der Menge des veraschten Organs aus den gemessenen Impulszahlen (Ipm) berechnet.

Abb. 1 :

Zone I = Stratum labyrinthicum
Diese Zone entspricht in der herkömmlichen histologischen Klassifizierung (BUCHER, O. 1973; Abb. 2) der Rindenschicht. In ihr befinden sich, bei Vernachlässigung der Aa. und Vv. radiatae, Arteriolae afferentes und efferentes, Glomerula und Zellen des Interstitiums, zu 7o % Hauptstücke (Partes contortae, Tubuli contorti I), zu 2o % Mittelstücke (Partes contortae, Tubuli contorti II) und zu etwa 1o % Abschnitte des dikken Teils der HENLE-schen Schleife, Verbindungsstücke und Sammelrohre.

Zone II = Stratum subcorticale
Der Außenstreifen der äußeren Markzone (BUCHER) wird hauptsächlich von Hauptstücken (Pars recta des proximalen Tubulus), weniger dicken Teilen der aufsteigenden HENLE-schen Schleife (Mittelstück, pars recta) und unverzweigten Sammelrohren gebildet.

Zone III= Zona intermedia
Der Innenstreifen der äußeren Markzone enthält Überleitungsstücke, den Scheitel kurzer Schleifen und unverzweigte Sammelrohre; hauptsächlich aber den dicken und auch den dünnen Teil der HENLE-schen Schleife.

Zone IV=Zona basalis
Dieser, der Innenzone des Marks entsprechende Nierenabschnitt, wird in der Hauptsache durch die Markpapille repräsentiert. Er enthält Überleitungsstücke, die Scheitel langer Schleifen (dünne Teile der HENLE-schen Schleife) und verzweigte Sammelrohre.

Bei der Auswertung wurden Zellen des proximalen Tubulus, welche gut von den Mittelstücken zu unterscheiden sind, in Zone I oder II, sowie Epithelzellen des dicken Teils der aufsteigenden HENLE-schen Schleife in Zone III untersucht (A und B in Abb. 2). Da bereits bei geringer Vergrößerung (8o - 2oo-fach) in allen Schnitten, vorwiegend im Bereich des Stratum labyrinthicum, Tubuli mit zum Teil erheblichen Cytoplasmaeinschlüssen auffielen, wurden diese ebenfalls in die Untersuchung miteinbezogen.

Andere Tubulusstrukturen, insbesondere die Epithelien der Sammelrohre, waren mangels ausreichender Cytoplasmafläche den angewandten Methoden der quantitativen Autoradiographie (s.u.) nicht zugänglich und mußten deshalb unberücksichtigt bleiben.

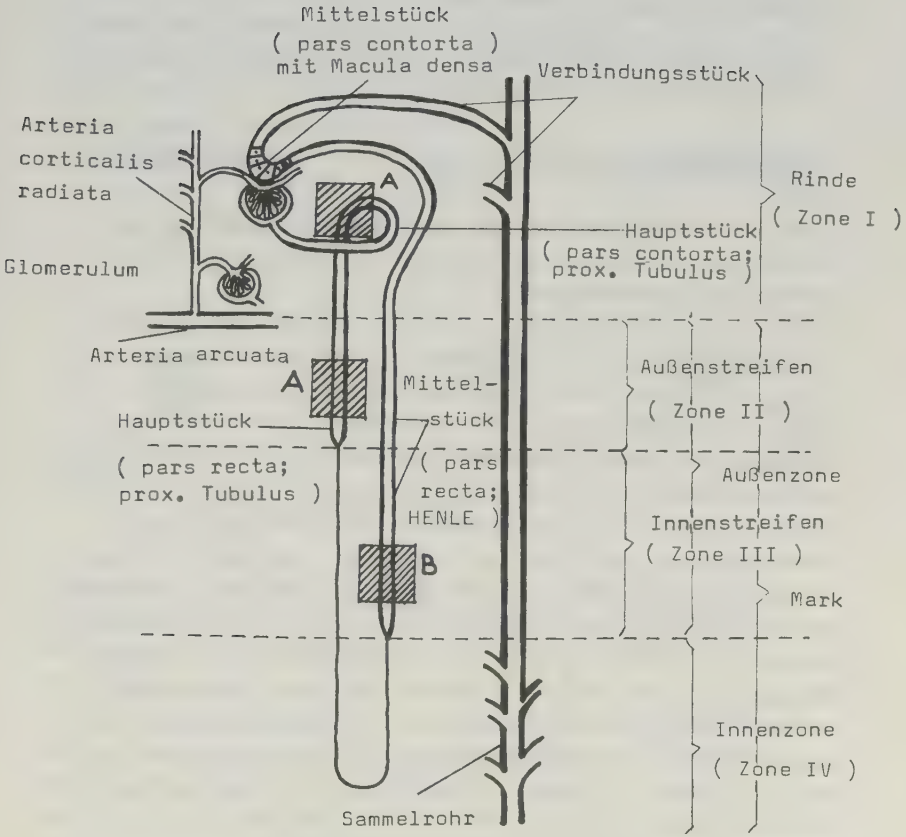

Mittelstück
(pars contorta)
mit Macula densa
Verbindungsstück
Arteria
corticalis
radiata
A
Rinde
(Zone I)
Hauptstück
(pars contorta;
prox. Tubulus)
Glomerulum
Arteria arcuata
A
Mittel-
stück
Außenstreifen
(Zone II)
Hauptstück
(pars recta;
prox. Tubulus)
(pars
recta;
HENLE)
Außenzone
Innenstreifen
(Zone III)
B
Mark
Innenzone
(Zone IV)
Sammelrohr

Abb. 2 :

Schematische Darstellung eines Nephrons mit langer HENLE-schen Schleife und der verschiedenen Nierenzonen
(verändert nach BUCHER, O. 1973)
Untersuchte Strukturen:

Proximaler Tubulus bei A
Dicke HENLE-sche Schleife bei B

2. Silberkornzählung

Zur quantitativen Analyse der Autoradiogramme wurde das einfache und bewährte visuelle Verfahren der Silberkornzählung herangezogen.

Da die Reichweite der ß - Teilchen in der photographischen Emulsion wegen der geringen Energie des Tritiums ($E_{\beta max}$ = 18 keV) nur etwas weniger als 1 µ beträgt, sind die Silberkörner in der untersten Schicht des Films zu finden und damit eindeutig den verschiedenen Zellstrukturen zuzuordnen. Dieses gute Auflösungsvermögen und die Tatsache, daß die ß - Teilchen des Tritiums prinzipiell nicht mehr als ein Silberkorn erzeugen, hat die tritiierten Substanzen zum bevorzugten Vorläufer in der quantitativen Autoradiographie gemacht (PERRY, R.P. 1964; SCHULTZE, B. 1968; AMLACHER, E. 1974). Da durch Konfluenz bei der Entwicklung oder enge benachbarte Lage der Latenzbilder gelegentlich doppelte Silberkörner entstehen können, wurde von Anfang an festgelegt, die als solche erkennbaren Doppelbildungen als zwei Körner zu zählen. Auch in Konglomerationen, Vierergruppen oder Silberkornketten wurde versucht, jedes einzelne Korn zu erfassen.

Ausgewertet wurden die Autoradiogramme lichtmikroskopisch bei 1ooo - facher Vergrößerung (8 x 1oo x 1.25) mit Ölimmersion. Die Auszählung über dem Cytoplasma erfolgte mit Hilfe einer Okularmeßplatte, deren Zählnetz in Quadrate von 5 µ Seitenlänge eingeteilt war. Von den

auf den Seitenlinien der Quadrate liegenden Silberkörnern wurden nur die auf einer senkrechten und einer waagrechten Linie liegenden (in L - Form) gewertet. Es wurde darauf geachtet, Interzellularspalten, Lumina oder Kernteile zu meiden und die Standardfläche vollständig über das Cytoplasma der Zellen zu legen. Soweit keine Zellgrenzen zu erkennen waren, wurde das Zählquadrat auch über diese hinaus direkt in das Cytoplasma der nächsten Zelle gelegt (Abb. 3).

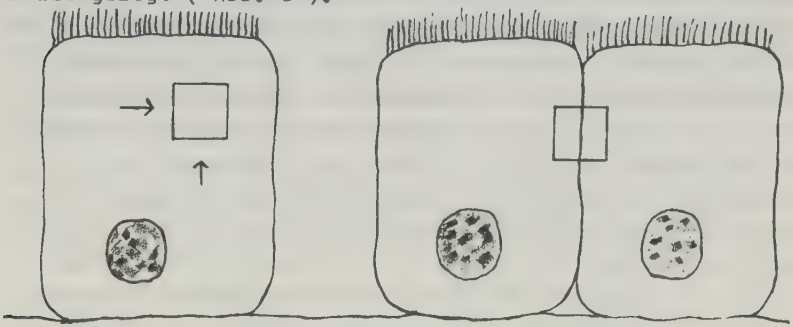


Abb. 3 :

Lage der Zählquadrate im Cytoplasma; L - Zählung →

Dies war vor allem im Bereich der mit Einschlüssen zum Teil erheblich überladenen Tubuli möglich, bei welchen Cytoplasma und Zellstrukturen oft völlig verdrängt erschienen.

Beim Vergleich der 1o und 3o Tage lang exponierten Autoradiogramme zeigte sich eine zu geringe Silberkorndichte der ersteren Präparate, so daß wegen der großen Zahl an nicht markierten Planquadraten keine Normalverteilung der Silberkornzahl pro Flächeneinheit vorlag. Aus diesem Grunde wurden für die Cytoplasma- und Kernuntersuchungen nur die 3o Tage belichteten Schnitte verwendet, bei denen eine ausreichend genaue Normalverteilung ermittelt werden konnte. Pro Tubulusabschnitt wurden 15o Zählquadrate und von diesen je 5o in drei verschiedenen Gebieten des Nierenschnittes ausgezählt.

Der Mangel an zusammenhängender Cytoplasmafläche machte die Anwendung dieser Methode vor allem an den Epithelien der Sammelrohre unmöglich (s.o.).

Des weiteren sollten die Kerne (ohne Differenzierung des Nucleolus) als flächenmäßig gut definierte Struktur in den verschiedenen Tubulusepithelzellen untersucht werden. Es wurden nur rund angeschnittene Kerne ausgewählt und ihre absolute Silberkornzahl, einschließlich der auf der Kernmembran befindlichen Körner bestimmt. Vorher erfolgten mit einem Skalamikrometer zwei aufeinander senkrechte Messungen des Kerndurchmessers und die Berechnung des Mittelwertes. Bei Differenzen der beiden Durchmesser von $\geq 1\ \mu$ wurde der Kern von der Wertung ausgeschlossen, bei Unterschieden von o.5 μ wurde der niedrigere Wert nicht um o.25, sondern um o.3 μ erhöht, um den durch die Zählung des gesamten Kernumfanges entstandenen Fehler zu verringern. Zunächst wurden 15o Kerne aus möglichst denselben Präparatgebieten wie bei der Cytoplasmazählung ausgewertet. Beim Vergleich der Silberkorndichte pro 25 μ^2 Kernfläche nach 5o, 1oo und 15o ausgezählten Kernen stellte sich heraus, daß sich weder der Mittelwert deutlich veränderte, noch die Standardabweichung verkleinerte, so daß die Zählung von 1oo Kernen ausreichend erschien.

Schließlich wurde noch bei 1ooo - facher Vergrößerung die mittlere Kernzahl pro Blickfeld (1oo x 1oo = 1o ooo μ^2) für die Tubuli mit und ohne sehr viele Cytoplasmaeinschlüsse bestimmt. Hierzu wurden in je 5o Blickfeldern pro Präparat und Tubulusstruktur die Kerne aller Tubulusepithelzellen, jedoch nicht die der Interstitialzellen, Sammelrohre und Glomerula herangezogen. Innerhalb dieser Flächen sollten sich so weit wie möglich nur Tubuli mit beziehungsweise ohne viele Einschlüsse befinden. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, wurden einzelne Felder mit sehr stark dilatierten Tubuli oder Sammelrohren sowie Glomerulumabschnitten übergangen.

VI. Berechnungen

a) Die Berechnung der Kernflächen (F_K) erfolgte aus den mittleren okularmikrometrisch gemessenen Kerndurchmessern nach der Formel : $F_K = r_{mittel}^2 \cdot \pi$

b) Zunächst erfolgte die Bestimmung der Silberkornzahl pro Kern ohne Berücksichtigung der Kerngröße.

c) Die Silberkornzahl pro Kernfläche wurde anschließend auf 25 μ^2 (wegen Vergleich mit Cytoplasma-Standardfläche) und die SKZ pro 1 μ^2 umgerechnet.

d) Auch die Kornzahl je Planquadrat (25 μ^2) Cytoplasmafläche wurde auf 1 μ^2 bezogen.

e) Um die Vergleichbarkeit der verschiedengewichtigen Tiere sicherzustellen, wurde die Silberkorndichte über Kern und Cytoplasma folgendermaßen korrigiert:

mittl. korrigierte Silberkorndichte $SKD_{korr.}$ =

$$\frac{\text{SKZ}}{(25 \text{ bzw. } 1)\ \mu^2} \Big/ \frac{\text{applizierte Gesamtaktivität, mCi}}{\text{1oc g Tiergewicht}}$$

Von einem Tischcomputer wurde zu allen mittl. korr. Silberkorndichten die Standardabweichung ausgedruckt.

f) Die Bestimmung der gesamten $SKD_{korr.}$ für alle untersuchten Strukturen (Kern + Cytoplasma; Tubulus mit vielen und wenigen Lysosomen + HENLE-sche Schleife) eines Präparates bzw. einer Versuchsgruppe ermöglichte die Gegenüberstellung mit den Ergebnissen der TriCarb - Messungen.

g) Für die $SKD_{korr.}$ / 25 μ^2 Kern- bzw. Cytoplasmafläche wurde ferner ein Mittelwertvergleich durchgeführt. Die Berechnungen bezogen sich auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit von a) p = o.1 % (P = o.oo1), was einer statistischen Sicherheit von 99.9 % entspricht und b) p = 4.55 %, entsprechend einer Sicherheit von 95.45 %. Die Vertrauens-

intervalle sind für a) $\bar{x} \pm 3.29 \cdot s_{\bar{x}}$ und für b) $\bar{x} \pm 2 \cdot s_{\bar{x}}$. Hierbei bedeuten:

$\bar{x}$ = Mittelwert

$s_{\bar{x}}$ = Standardfehler; mittlerer Fehler des Mittelwertes

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dabei gilt:

s = Standardabweichung, Streuung der Einzelwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

Da der Standardfehler weniger vom Verteilungstyp (z.B. Normalverteilung) der Grundgesamtheit beeinflußt wird, ist ihm beim Vergleich statistischer Meßreihen gegenüber der Berechnung der Standardabweichung der Vorrang zu geben (vgl. AMLACHER, E. 1974).

h) Berechnung der Quotienten:

$$\frac{\text{SKD (korr.) im prox. Tubulus mit bzw. ohne Einschlüsse}}{\text{SKD (korr.) in der HENLE-schen Schleife}}$$

sowohl für Kern- wie Cytoplasmafläche.

i) Berechnung der mittleren Kernzahl pro Blickfeld (einschließlich Standardabweichung) für jedes Einzeltier.

j) Berechnung der mittleren Kerndurchmesser (mit Standardabweichung) der Epithelzellen des proximalen Tubulus und der HENLE-schen Schleife.

k) Bildung des Quotienten aus der korrigierten Silberkorndichte des Cytoplasmas und der Kernfläche:

$$SKD_{cyt} \;/\; SKD_{kern}$$

l) Bei den Aktivitätsmessungen wurde der Quotient

$$Q = \frac{\text{gemessene Impulse pro Minute (Ipm)}}{\text{Trockenorganeinwaage in g}} \quad (\text{in } \mu\text{Ci umgerechnet})$$

mit der verabreichten Aktivität in µCi pro g Tiergewicht korrigiert.

$$Q = \frac{\text{Ipm (bzw. } \mu\text{Ci)}}{g} \Big/ \frac{\mu Ci}{g}$$ (vgl. Abschnitt IV,C)

Der Q - Wert der Kontrollgruppen wurde = 1 gesetzt.

C. E R G E B N I S S E

I. Vorbemerkungen

a) Für die vorliegenden Ergebnisse mußte bei allen autoradiographischen Untersuchungen auf ein Versuchstier der Gruppe II (Diabetes insipidus ohne Vorbehandlung) verzichtet werden, weil bei ihm hochgradige Hydronephrose vorlag und deswegen keine verwertbaren Nierenautoradiogramme hergestellt werden konnten. Für spezielle Beobachtungen (Kernzahl/Blickfeld und mittlerer Kerndurchmesser) wurden nachträglich dennoch Nierenschnitte angefertigt und mit herkömmlichen Verfahren gefärbt. Trotzdem mußte die Auswertung dieser Präparate mit größter Vorsicht erfolgen, da in ihnen kaum noch gut erhaltenes Nierengewebe aufzufinden war.

b) Beim orientierenden Durchmustern der Präparate waren die zahlreichen Tubuli mit Cytoplasmaeinschlüssen aufgefallen (s.o.). Nachdem sich bereits nach den ersten Zählungen deutliche Unterschiede zu den Tubuli ohne solche Einschlüsse abzeichneten, entschlossen wir uns, diese Abschnitte ebenfalls in allen Präparaten zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, daß die Einschlüsse durchaus nicht bei allen Tieren gleich deutlich zu erkennen waren. Ein Vergleich mit 38 Brattleboro - Ratten einer anderen Arbeit (HÖRING, E. 198o) konnte einen Zusammenhang zwischen den Einschlüssen und der Versuchsanordnung nicht sichern. Vielmehr scheint es sich um eine individuell verschieden stark entwickelte Eigenschaft zu handeln, deren Parameter in unseren Versuchen nicht erfaßt wurden.

c) Auch die Deutlichkeit und Größe der Silberkörner schwankte von Präparat zu Präparat, war aber innerhalb eines Schnittes ziemlich konstant.

d) Die im Vergleich zu anderen Rattennieren stärkere Dilation der Sammelrohre und teilweise auch der Tubuli lag bei allen Tieren mehr oder weniger ausgeprägt vor. Es war hierbei kein Unterschied zu den Long Evans - Kontrolltieren festzustellen.

e) Der Extremfall einer solchen Dilatation fand sich bei einem Versuchstier (D.I. ohne Vorbehandlung; RNS - Serie von HÖRING, E. 198o), bei welchem die Tubuli stark und einzelne Sammelrohre sogar cystisch erweitert waren. In den Lumina dieser Sammelrohre war reichlich Protein nachweisbar (Abb. 4). Auch die Ausbildung der Cytoplasmaeinschlüsse, welche hier bis in die Hauptstücke des Stratum subcorticale reichte, war besonders gut zu erkennen.

Abb. 4 :
Schnitt durch die Zona intermedia und Zona basalis (Nierenpapille) der Niere einer Diabetes insipidus - Ratte. Deutliche Dilatation der Tubuli und Sammelrohre, in welchen ausgeprägte Eiweißzylinder erkennbar sind.
Pearse, 1 : 68

II. Beschreibung der Tubuli mit vermehrten Cytoplasmaeinschlüssen und Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die Tubuli mit Cytoplasmaeinschlüssen wurden vornehmlich im Stratum labyrinthicum beobachtet. Diese Einschlüsse kamen dort teilweise in solcher Menge vor, daß zwischen ihnen kaum noch " normale " Tubulusepithelzellen zu sehen waren. Andererseits mußten durchaus nicht immer alle Zellen eines Tubulusquerschnittes betroffen sein, denn es gab Nephren, in denen Epitheloidzellen mit und ohne diese Veränderungen nebeneinander existierten. (Ähnliche Beobachtungen erklären CAIN, H. und FAZEKAS, S. 1963 durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren, von denen einer die führende,formbestimmende Rolle übernehmen könne. Solche Faktoren seien beispielsweise: kolloidale und cytoarchitektonische Verhältnisse, momentaner Aktivitätszustand der einzelnen Zelle, Eigenart des Biotops, Versorgung vom Blutstrom her, zellinneres und umgebendes Milieu und osmotische Verhältnisse.) Innerhalb großer Felder so veränderter Tubuli ließen sich trotzdem die einschlußarmen Zellen des distalen Konvoluts (Tubuli contorti II) identifizieren, so daß die Vermutung nahe liegt, daß es sich bei der starken Vakuolenbildung um eine Eigenheit besonders des proximalen Tubulus bzw. Konvoluts (Tubuli contorti I) handelt.

Schon bei geringer Vergrößerung (8o bis 1oo - fach) fiel der Verlust der lichtmikroskopischen Abgrenzbarkeit von Zelleib und Bürstensaum bei diesen Zellen auf. Dieser Verlust konnte auch in schwieriger differenzierbaren Präparaten als Unterscheidungsmerkmal gegenüber den unveränderten Epithelien mit kräftiger basaler Cytoplasmafärbung verwendet werden (Abb. 5).

Die Cytoplasmaeinschlüsse selbst waren von unterschiedlicher Größe (bis über Kerngröße, also 6 μ) und in manchen Zellen so zahlreich vorhanden, daß sämtliche Zellstrukturen verdrängt und keine Zellgrenzen (besonders

auch kein Bürstensaum, s.o.) mehr erkennbar waren. Zuweilen lag statt eines normalen Tubulusquerschnittes nur noch ein entsprechendes Feld von Cytoplasmavakuolen vor (Abb. 6 a, b).

Auch scheint man zwei Kerntypen unterscheiden zu können, nämlich gegenüber normalen Tubuli deutlich vergrößerte und andererseits kleine, chromatindichte, manchmal unregelmäßig bizarre oder pyknotische Kerne (Abb. 6, 8 und 1o).

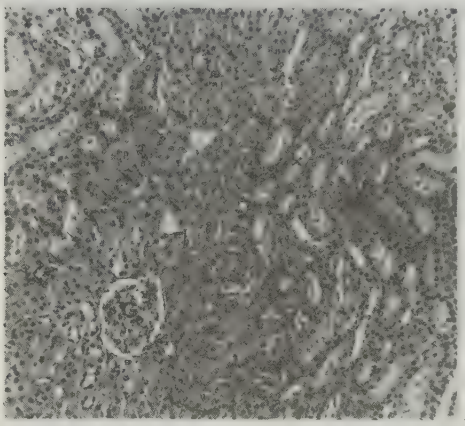
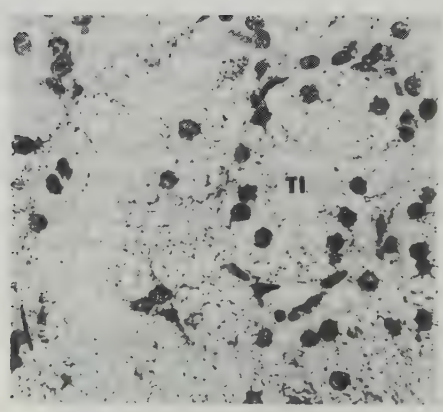


Abb. 5 :

Schnitt durch das Stratum labyrinthicum einer Brattleboro - Rattenniere. Verlust der lichtmikroskopischen Differenzierbarkeit von Zelleib und Bürstensaum durch Überladung von proximalen Tubuluszellen mit Cytoplasmaeinschlüssen in der Umgebung des Glomerulums (⟶). Daneben (x) normale Tubulusepithelien. G = Glomerulum. H.E., 1 : 1o7



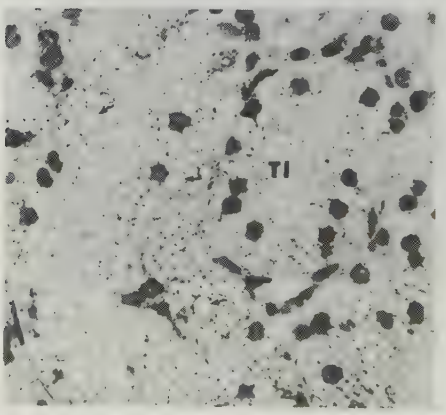


Abb. 6 a, b :

Schnitt durch das Stratum labyrinthicum der Niere einer Diabetes insipidus - Ratte. Verdrängung der Zellstrukturen und Kerne durch die zum Teil sehr großen Vakuolen. Deformierung der Zellkerne. Die Cytoplasmaeinschlüsse sind weitgehend markierungsfrei (⟶).

Tl = Tubuluslumen

a) Objektebene

b) Silberkornebene

H.E., 1 : 429

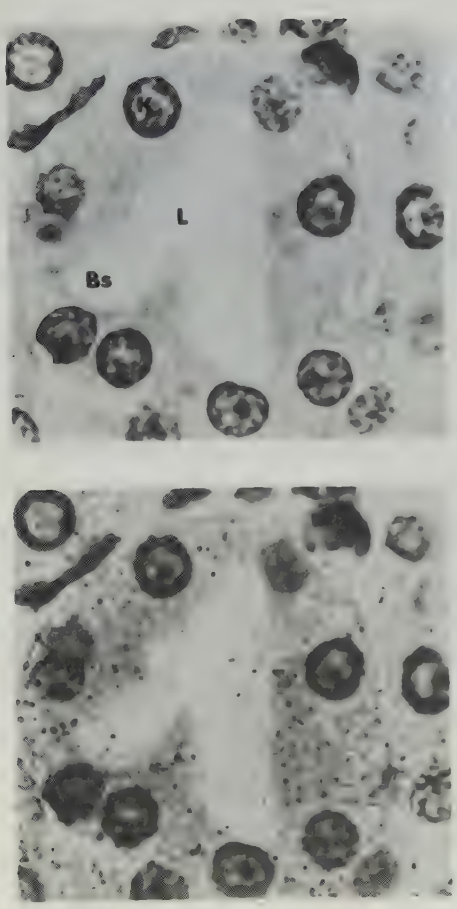


Abb. 7 a, b :

Querschnitt eines normalen proximalen Tubulus der Niere einer Brattleboro - Ratte. Man erkennt die geordnete Zellstruktur, basale Lage der Kerne und gute Ausbildung des Bürstensaums. Es liegen nur wenige Cytoplasmaeinschlüsse vor.

L = Lumen
K = Zellkern
Bs = Bürstensaum
a) Objektebene
b) Silberkornebene
H.E., 1 : 1o71

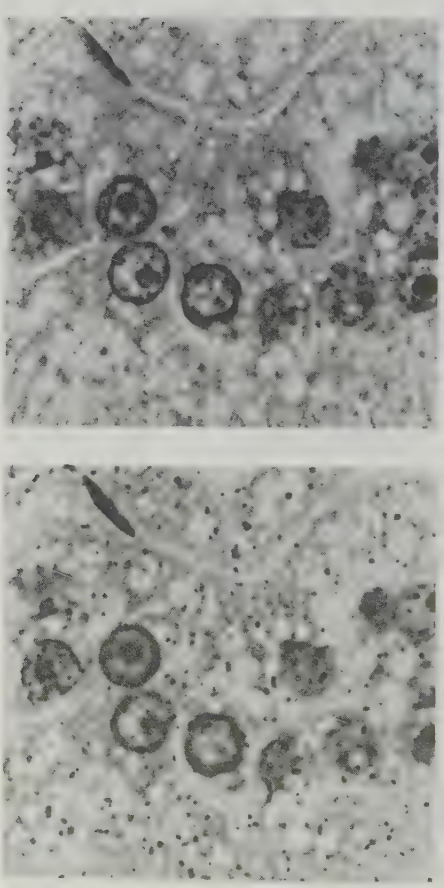


Abb. 8 a, b :

Starke Lysosomenbeladung der proximalen Tubuluszellen einer Diabetes insipidus - Rattenniere. Große, bläschenförmige, zum Tubuluslumen gedrängte Zellkerne. In den Vakuolen befinden sich praktisch keine Silberkornmarkierungen. Trotzdem ergibt sich eine gegenüber Abb. 7 erhöhte Silberkorndichte.

a) Objektebene

b) Silberkornebene

H.E., 1 : 1o71

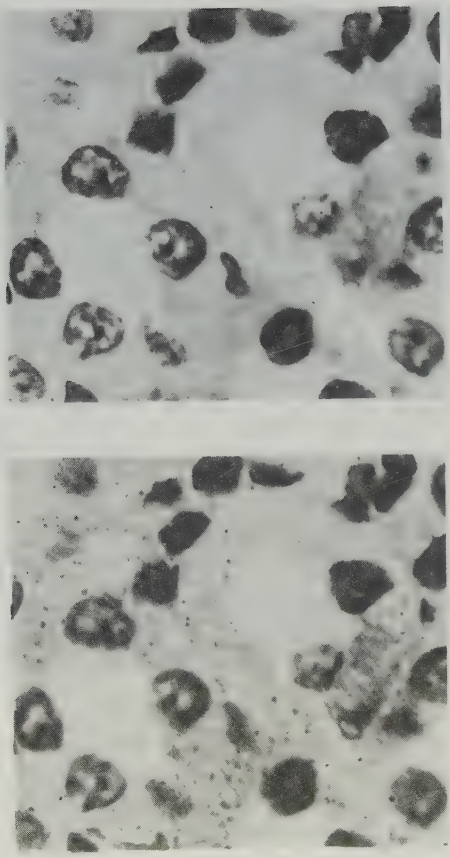


Abb. 9 a, b :

Schnitt durch die HENLE-sche Schleife der Niere einer Diabetes insipidus - Ratte. Die flachen Epithelien besitzen keinen sichtbaren Bürstensaum. Geringe ^{3}H - l - Phenylalaninaktivität.

a) Objektebene

b) Silberkornebene

H.E., 1 : 1o71

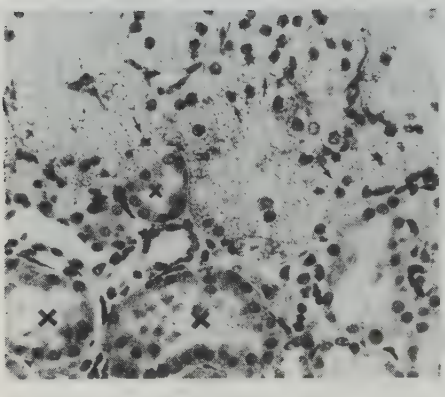


Abb. 1o :

Schnitt durch das Stratum labyrinthicum der Niere einer Diabetes insipidus - Ratte. Man sieht kleine, durch die Lysosomen deformierte Zellkerne in denen Tubuli mit Vakuolen (⟶). Daneben unveränderte Tubulusquerschnitte mit normalen Kernen (x).
H.E., 1 : 269

Zur genaueren Darstellung der Vakuolen und zur Identifizierung ihres Inhaltes sollten die Semidünnschnitte und elektronenmikroskopischen Aufnahmen beitragen.

a) Die Semidünnschnitte

Durch diese Technik wurden die Vakuolen besonders gut dargestellt. Die Pigmentgranula zeigen innerhalb der Epithelien eine Ausrichtung zur Zellbasis. Die stärkste Ausbildung in den Zellen der pars contorta des proximalen Tubulus entspricht den lichtmikroskopischen Befunden. Auffallend ist eine starke Granulierung der Zellen des Juxtaglomerulären Apparats (Abb. 11). Sie kann als Hinweis für eine verstärkte Reninsynthese in den Nieren der Brattleboro - Ratten gewertet werden (vgl. S. 53 und 64).

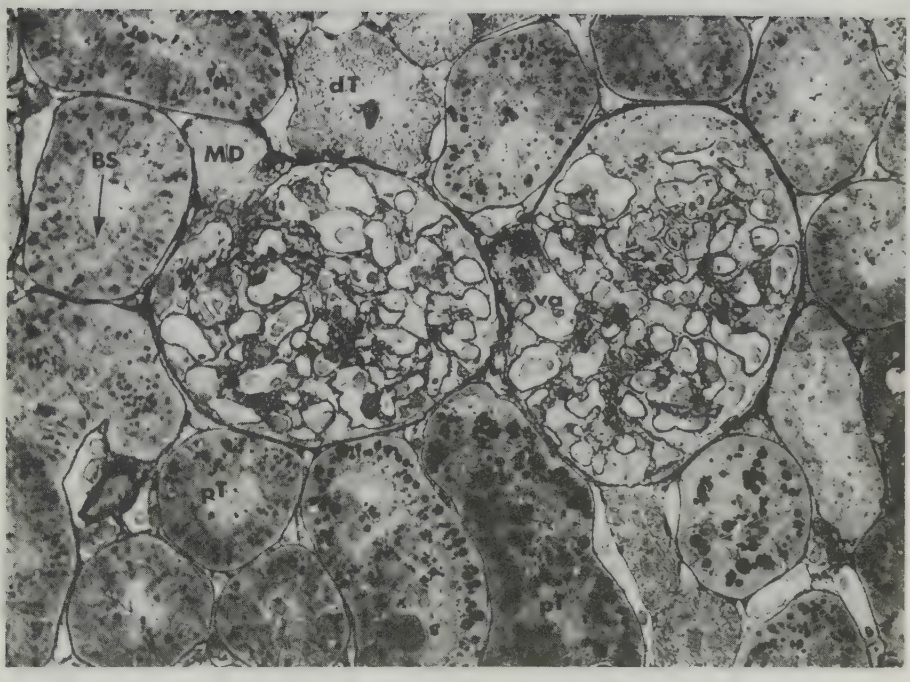


Abb. 11 :

Zwei Glomerula einer D.I. - Ratte mit leichter Hypertrophie des Juxtaglomerulären Apparats (li) und kräftiger Granulierung der epitheloiden Zellen des vas afferens (re). In den proximalen Tubuli zahlreiche Pigmentgranula.

BS = Bürstensaum
dT = distaler Tubulus
MD = Macula densa
va = vas afferens
pT = proximaler Tubulus
Silbermethamingefärbter Semidünnschnitt 1 : 52o

b) Die elektronenmikroskopischen Bilder

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen findet man elektronendichte Zelleinschlüsse mit mehr oder weniger amorphem Inhalt, lamellären und granulären Strukturen, sogenannten " Myelinfiguren " und Resten von eingeschlossenen Mitochondrien und anderen Zellorganellen. Solche Zellinklusionen sind seit langem bekannt und wurden von verschiedenen Autoren mit Hilfe differenter Methoden als Lysosomen im Sinne von De DUVE (1963) identifiziert. Wir müssen daher annehmen, daß es sich bei den von uns beobachteten Vakuolen um Auto- und Heterophagolysosomen (Eiweißresorption) handelt (vgl. MARX, R., MOELBERT, E., ZOLLINGER, H.U. 1965; weitere Literaturangaben S. 66ff.) (Abb. 12 und 13).

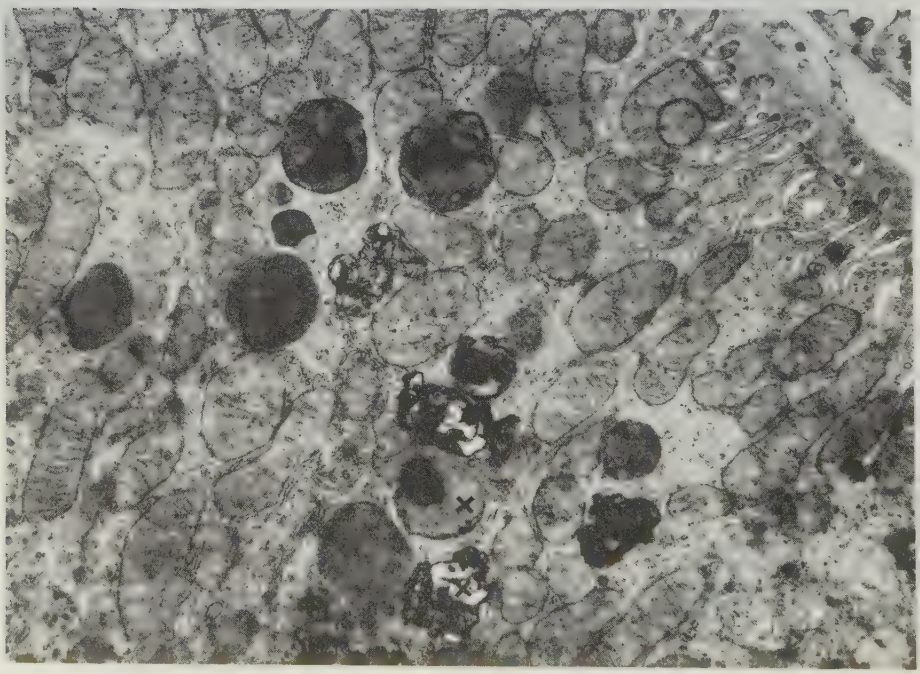


Abb. 12 :

Basaler Ausschnitt einer Zelle des proximalen Tubulus einer Diabetes insipidus - Ratte mit zahlreichen lamellären, granulären und amorphen Inklusionen (x).
1 : 1o287

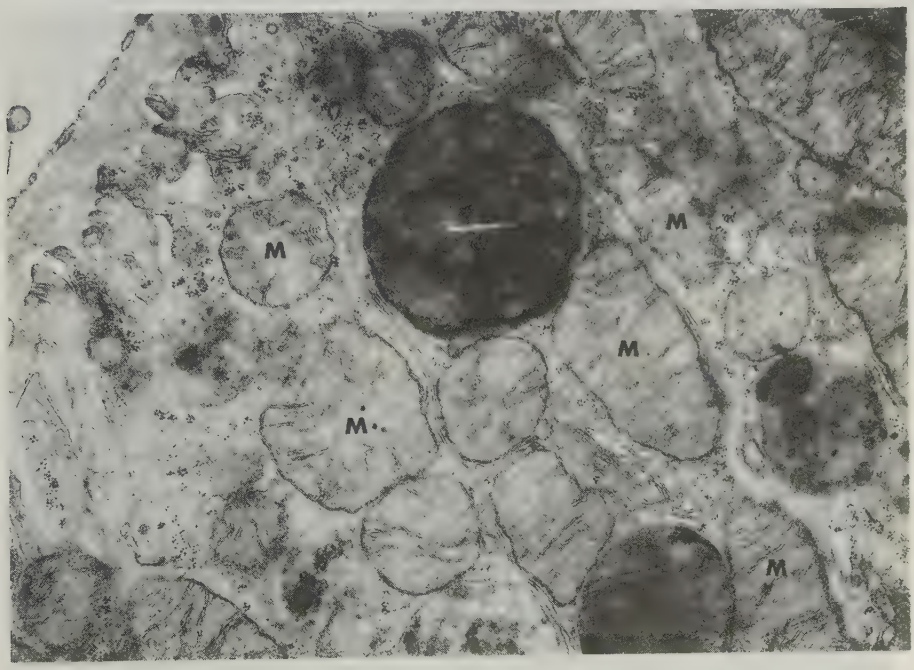


Abb. 13 :

Drei Vakuolen mit elektronendichtem Material zwischen Mitochondrien (M) einer proximalen Tubuluszelle einer Diabetes insipidus - Ratte.
1 : 17857

Wenn wir im Folgenden die Bezeichnung " Tubuli mit Vakuolen " oder " mit Cytoplasmaeinschlüssen " verwenden, so ist uns dabei bewußt, daß alle Tubulusepithelzellen Lysosomen besitzen. Wir benutzen diesen Ausdruck demnach nur der Einfachheit halber zur Abgrenzung gegenüber den Zellen mit normalem Phagolysosomengehalt und meinen damit " Tubuluszellen mit überdurchschnittlich starker Lysosomenbeladung ".

Hinweise auf eine veränderte (insbesondere verstärkte) Eiweißsynthese schienen sich zunächst in den Tubuli mit Phagolysosomen nicht nachweisen zu lassen. Bei gezielter Suche jedoch konnte ein Lysosomenkomplex gefunden werden, in dessen Umgebung eine deutliche Vermehrung des rauhen endoplasmatischen Retikulums vorliegt, so daß eine Steigerung der Proteinsynthese in diesen Zellen zumindest nicht ausgeschlossen ist (Abb. 14).

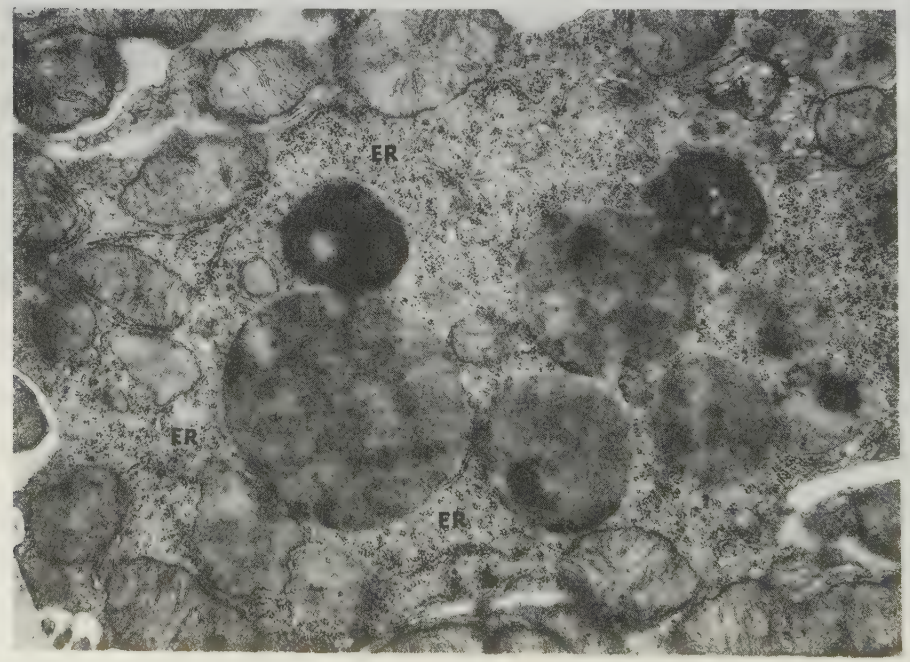


Abb. 14 :

Elektronenmikroskopische Aufnahme aus dem basalen Abschnitt des proximalen Tubulusepithels einer Diabetes insipidus - Ratte mit dichten lysosomalen Restkörpern und einer deutlichen Hypertrophie des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (ER).
1 : 17143

III. Die mittlere Silberkornzahl pro Kern und die mittlere Kerngröße

a) In Figur 1 wurde die mittlere Kornzahl pro Kern, ohne Berücksichtigung der Kerngröße für alle Versuchsgruppen und untersuchten Tubulusstrukturen dargestellt.

Es fällt das gleichartige Verhalten aller drei Strukturen bei den verschiedenen Versuchen auf. Dabei ist die Silberkornzahl pro Kern in der HENLE-schen Schleife unter allen Versuchsbedingungen (mit Ausnahme eines Kontrolltieres; vgl. Tab. 1) deutlich geringer als im proximalen Tubulus, bei welchem wiederum die Abschnitte mit Cytoplasmaeinschlüssen in jedem Fall die höchsten Werte aufweisen. Die eindeutige Erhöhung der Silberkornzahl unter den Bedingungen der Dauerinfusion und im Durstversuch wird nur durch die Markierungen bei einem Tier (der Gruppe III) mit Dauerinfusion und ohne Tegretalapplikation (siehe Tab. 1) gestört (Ausreißer ?). Dieses Tier wurde deshalb zur Sicherheit noch einmal nachgezählt, jedoch ergaben sich keine entscheidend veränderten Werte.

Insgesamt waren die Silberkornzahlen in den Gruppen III und IV nicht signifikant gegenüber I und II erhöht.

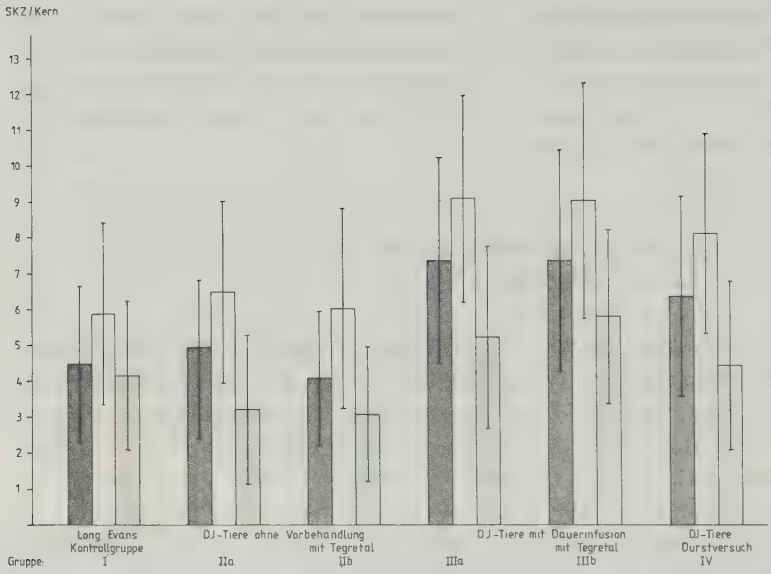


Fig. 1 :

Mittlere Silberkornzahl pro Kern und ihre einfache Standardabweichung

- im prox. Tubulus ohne Lysosomen
- prox. Tubulus mit Lysosomen
- und HENLE-scher Schleife

b) Die Figur 2 zeigt die mittleren Kerndurchmesser für die einzelnen Nephronabschnitte.

Aus den Säulendiagrammen läßt sich die Tendenz zu folgender Größenabstufung ablesen: Kerne der HENLE-schen Schleife (ca. 7.2 µ) > Kerne des proximalen Tubulus mit Vakuolen (ca. 6.7 µ) > Kerne des proximalen Tubulus ohne Vakuolen (ca. 6.4 µ) (vgl. Tab. 3).

Herrn Heribert Wolf danke ich für seine Hilfe bei der Anfertigung der Graphiken.

Innerhalb einer Kerngruppe ist der mittlere Durchmesser unter allen Versuchsbedingungen ziemlich konstant. Eine Ausnahme hiervon machen allerdings die Kerne der HENLE-schen Schleife in der Gruppe II (D.I. ohne Vorbehandlung), deren Durchmesser gegenüber den anderen Versuchsgruppen zum Teil signifikant erniedrigt sind (vgl. Tab. 2 und 3). Nach Umrechnung der Durchmesser auf die Kernflächen ergab sich ein mittlerer Flächenverlust von 23 % für diese Gruppe.

Wegen der Konstanz der Kerndurchmesser in den verschiedenen Tubuli (außer in der HENLE-schen Schleife) gibt bereits die mittlere SKZ/Kern einen groben Hinweis auf die Größe der Aminosäureinkorporation in diesen Epithelzellkernen.

Um den Einfluß der Kerngröße auf das Ausmaß der Kernmarkierungen festzustellen, wurden bei einem Tier (proximaler Tubulus mit Einschlüssen) neun auffallend große Kerne (mittl. Durchmesser 8.8 bis 1o.5 µ) ausgezählt und die korrigierte Silberkorndichte berechnet. Es zeigte sich dabei keine Veränderung der Aktivität pro Flächeneinheit gegenüber den Durchschnittskernen (von ca. 6.6 µ Durchmesser). Dies entspricht den Beobachtungen von SCHULTZE, B. (1968), die einen linearen Anstieg der inkorporierten Tritiumaktivität mit zunehmendem Kerndurchmesser innerhalb einer Reihe von Zellarten nachweisen konnten. Das bedeutet, daß die Aminosäureinkorporation pro Volumeneinheit bei allen Kernen einer Population etwa gleich, und damit die Gesamtaktivität über den großen Kernen entsprechend dem Größenzuwachs höher sein müßte.

In unseren Präparaten war die Zahl der großen Kerne so gering, daß ihre gesonderte Auswertung oder Berücksichtigung nicht notwendig erschien.

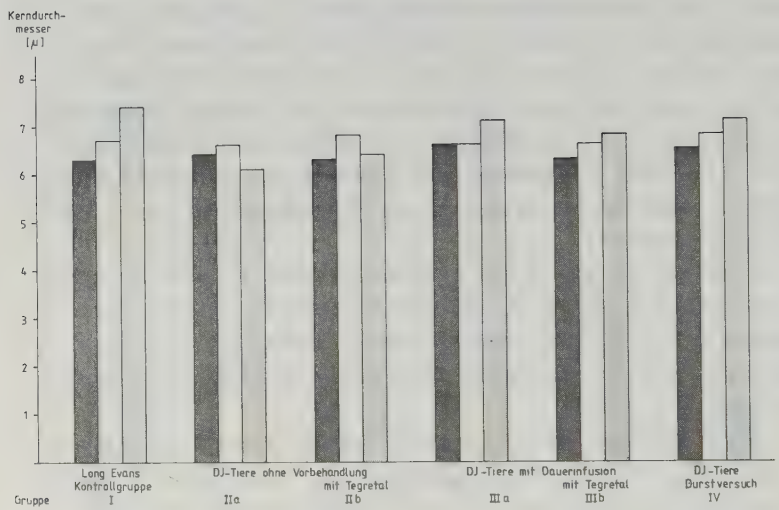


Fig. 2 :

Der mittlere Kerndurchmesser der Epithelzellen des

- prox. Tubulus ohne Lysosomen
- prox. Tubulus mit Lysosomen
- und der HENLE-schen Schleife

IV. Die korrigierte Tritiumaktivität über den verschiedenen Zell- und Tubulusstrukturen

Wegen der Vergleichbarkeit der Tiere errechneten wir für die folgenden Gegenüberstellungen die auf 1 μ^2 und das Tiergewicht korrigierten Inkorporationsraten (vgl. Abschnitt: Berechnungen, e).

a) Figur 3 bis 5 vergleicht die mittlere korrigierte Silberkorndichte über Kern und Cytoplasma in den drei untersuchten Nephronstrukturen. Trotz der großen Standardabweichungen läßt sich die Tendenz zu gesteigerten Aktivitäten über Kern und Cytoplasma bei der Dauerinfusion

und im Durstversuch in allen drei Figuren erkennen. Nur in der HENLE-schen Schleife ist die SKD beim Durstversuch nicht erhöht. Während die Aktivitätsinkorporation pro Standardfläche im proximalen Tubulus bei den Tieren der Gruppe I (Long Evans) und II (D.I. ohne Vorbehandlung) im Cytoplasma etwas höher als im Kern zu sein scheint, verschiebt sich dieses Verhältnis unter den Bedingungen der Dauerinfusion zum Kern (vgl. Abschnitt VII). Die Zahlen für die Durstversuche und die HENLE-sche Schleife liegen so eng beieinander, daß eine Aussage zum Kern - Plasma - Verhältnis in diesem Sinne nicht möglich ist, bzw. eine gleich große Inkorporation über beiden Strukturen anzunehmen ist.

Die Veränderungen über Kern und Cytoplasma verlaufen bei den meisten Tieren etwa gleichförmig, weswegen mit ansteigender Silberkorndichte über dem einen Zellkompartiment auch mit einem Anstieg über dem anderen zu rechnen ist.

Die Tegretal - Tiere zeigten innerhalb ihrer Gesamtgruppe keine deutlich veränderten Tendenzen.

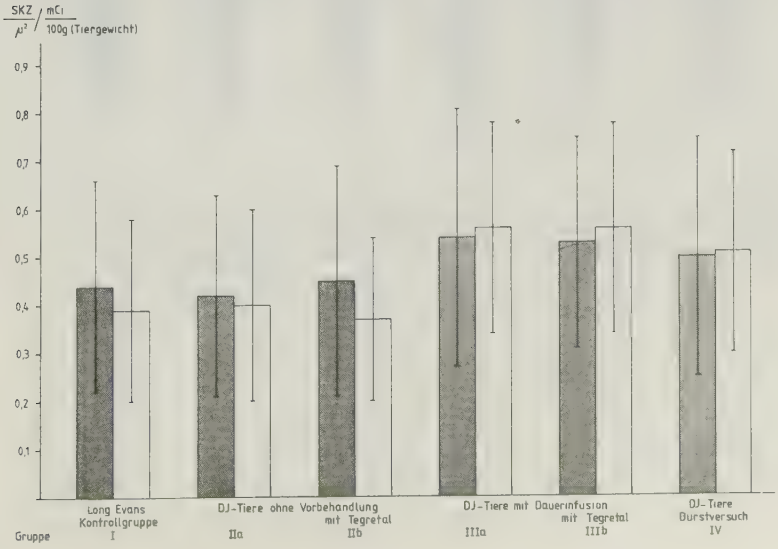


Fig. 3 :

Vergleich der Silberkorndichten im prox. Tubulus ohne Lysosomen

im Cytoplasma

und Kern

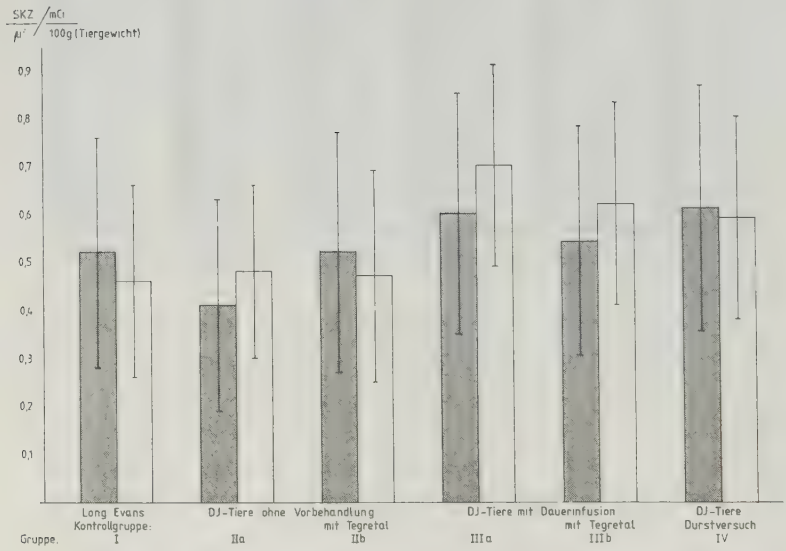


Fig. 4 :

Vergleich der Silberkorndichten im prox. Tubulus mit Lysosomen

im Cytoplasma

und Kern

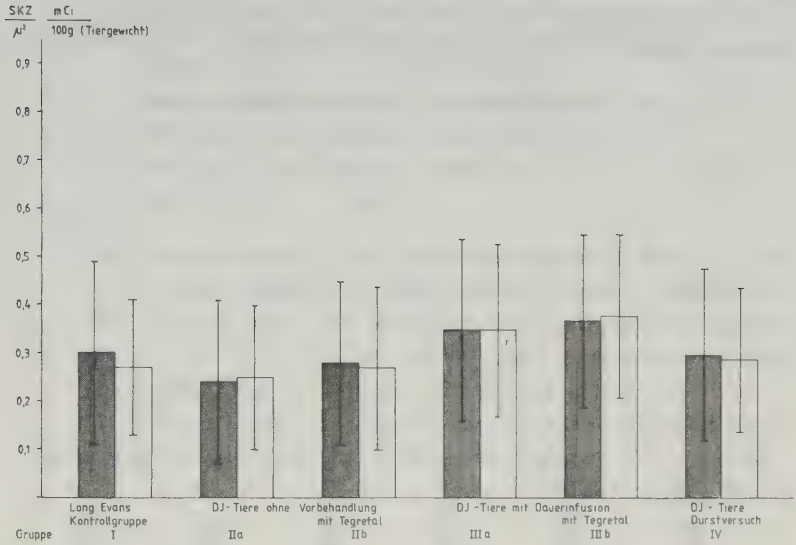


Fig. 5 :

Vergleich der Silberkorndichten in der HENLE-schen Schleife

▬ im Cytoplasma

▭ und Kern

b) Die Figuren 6 und 7 zeigen die mittlere SKD_{korr} in den einzelnen Tubulusabschnitten für Cytoplasma und Kern. Gegeneinander aufgetragen sind die Mittelwerte aus den beiden Tieren jeder Versuchsgruppe.

In allen Untersuchungen läßt sich eine leicht bis deutlich gesteigerte Aktivität im proximalen Tubulus mit Einschlüssen gegenüber dem ohne Einschlüsse feststellen. Dies gilt sowohl für den Kern wie für das Cytoplasma. Die Inkorporationsrate in der HENLE-schen Schleife bleibt bei allen Versuchen vergleichsweise am niedrigsten. Durch die Berechnung des Quotienten aus der SKD_{korr} im proximalen Tubulus und der SKD_{korr} in der HENLE-schen Schleife erhielten wir den Faktor, um den die Aktivität im proxi-

malen Tubulus höher als im distalen ist.

Der Steigerungsfaktor der Aktivität im proximalen Tubulus gegenüber der HENLE-schen Schleife:

prox. Tub. ohne Vakuolen	Cytoplasma:	1.3 bis 1.75
	Kern :	1.3 bis 1.8
prox. Tub. mit Vakuolen	Cytoplasma:	1.3 bis 2.2
	Kern :	1.5 bis 2.o

Der mittlere Steigerungsfaktor pro Flächeneinheit der Gesamtzelle (Kern + Cytoplasma) beträgt somit im proximalen Tubulus ohne Vakuolen ca. 1.54 $\pm$ o.25, im lysosomenbeladenen Tubulus ca. 1.75.

Auch die schon im letzten Abschnitt geschilderte vermehrte Aminosäureinkorporation bei der Dauerinfusion und im Durstversuch wird aus den Säulendiagrammen 6 und 7 klar ersichtlich.

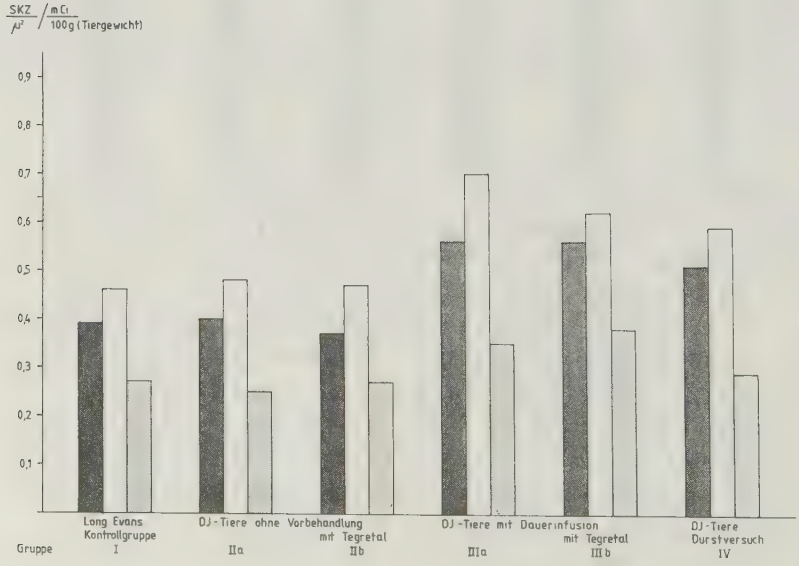


Fig. 6 :

Vergleich der Silberkorndichten im Cytoplasma des

- prox. Tub. ohne Lysosomen
- prox. Tub. mit Lysosomen
- und der HENLE-schen Schleife

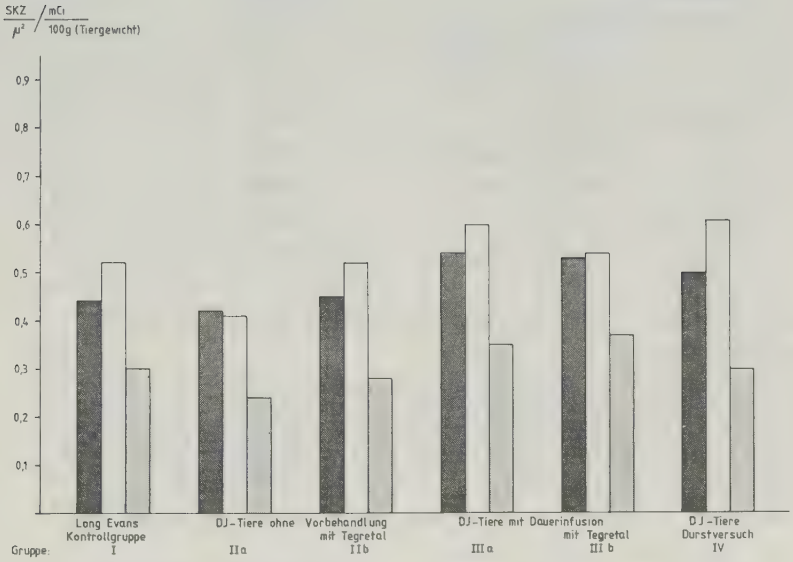


Fig. 7 :

Vergleich der Silberkorndichten im Kern des

- prox. Tub. ohne Lysosomen
- prox. Tub. mit Lysosomen
- und der HENLE-schen Schleife

V. Die mittlere Aktivität über dem Gesamtnephron

Um einen Vergleich der Tritiumaktivitätsmessungen im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (die alle Nierenzellen und nicht nur einzelne Nephronabschnitte erfassen) mit unseren Silberkornzählungen zu ermöglichen, errechneten

wir die Gesamtaktivität (als mittl. korr. SKZ/μ^2) über Cytoplasma und Kern aller untersuchten Tubulusabschnitte.

Die SKD_{korr} für das Gesamtnephron:

	$\frac{SKZ}{\mu^2} / \frac{mCi}{100\ g}$
Gruppe I	o.4o
Gruppe II gesamt	o.38
ohne Tegretal	o.37
mit Tegretal	o.39
Gruppe III gesamt	o.51
ohne Tegretal	o.51
mit Tegretal	o.49
Gruppe IV	o.47

Die Ergebnisse dieser Berechnungen wurden in Figur 8 aufgezeichnet.

Es zeigt sich hierbei eine gegenüber den Kontrolltieren geringfügig erniedrigte SKD_{korr} bei den Diabetes insipidus - Ratten der Gruppe II (ohne Vorbehandlung) ohne Gabe von Carbamazepin. Bei den Tegretaltieren dieser Gruppe findet man eine Steigerung auf den Ausgangswert der Long Evans - Tiere.

Die Aktivitätssteigerung bei der Dauerinfusion und im Durstversuch ist wieder deutlich erkennbar. Eine Wirkung von Tegretal ist hier nicht ersichtlich.

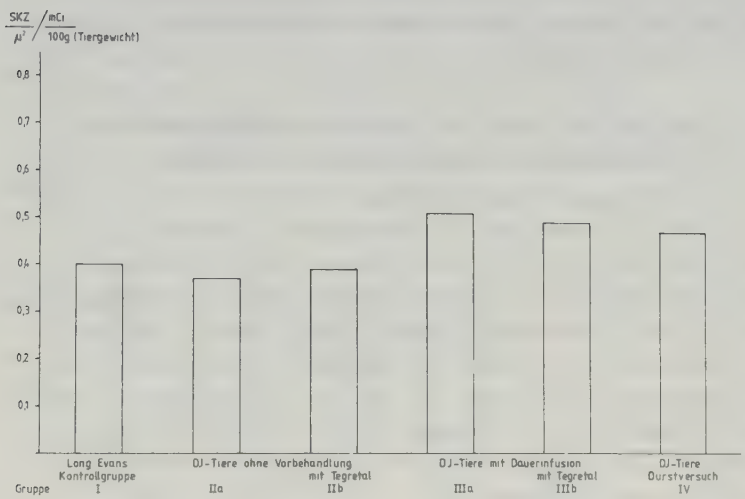


Fig. 8 :

Vergleich der mittleren SKD über allen untersuchten Nierenstrukturen (Cytopl. + Kern aus prox. Tub. mit/ohne Lysosomen + HENLE-scher Schleife) für die einzelnen Versuchsgruppen

VI. Mittelwertvergleich

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der gefundenen Mittelwerte führten wir zwei Mittelwertvergleiche durch (für p = o.1 % und p = 4.55 %. Vgl. Abschnitt: Berechnungen, g).

1. Für die Einzeltiere (Tabelle 6 und 7) läßt sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 99.9 % weder für das Cytoplasma noch für den Kern eine Aussage machen. Mittelt man jedoch die Versuchsgruppen (Figur 9 und 1o), so ist die korrigierte Silberkorndichte im Kern des proximalen Tubulus mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von o.1 % in den Gruppen III (Dauerinfusion) und IV (Durstversuch)

signifikant gegenüber den Kontrolltieren (I) und den Diabetes insipidus - Ratten ohne Vorbehandlung (Gruppe IIa und IIb) erhöht.

2. Die gemittelten Werte der Versuchsgruppen ergeben mit einer statistischen Sicherheit von 95.45 % :

a) Im Cytoplasma (Figur 9, Tabelle 6)

Die D.I. - Tiere ohne Vorbehandlung (Gruppe IIa,b) unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Im proximalen Tubulus mit und ohne Lysosomen, sowie in der HENLE-schen Schleife der Gruppen IIIa und b (Dauerinfusion ohne und mit Tegretal) findet man eine deutlich höhere Aktivität als bei den Long Evans - Tieren. Auch im Durstversuch (Gruppe IV) scheint die Eiweißsynthese im proximalen Tubulus gesteigert zu sein, wobei die Zellen ohne Lysosomen die statistische Sicherheit von über 95 % nicht erreichen. Die HENLE-sche Schleife zeigt einen den Kontrolltieren entsprechenden Wert.

b) Im Kern (Figur 1o, Tabelle 7)

Die Aktivität über den Epithelzellen bei den D.I. - Ratten ohne Vorbehandlung (IIa,b) entspricht der Kontrollgruppe.

Die Eiweißsynthese bei den überwässerten D.I. - Tieren (IIIa,b) ist über allen untersuchten Tubulusabschnitten signifikant höher als bei den Long Evans - Ratten.

Durch den Durstversuch wurde die Inkorporationsrate nur über den Kernen des proximalen Tubulus mit und ohne Lysosomen deutlich gesteigert. Bei der Betrachtung der Einzelwerte (Tabelle 7) ist bemerkenswert, daß bei neun von elf Tieren die Aktivität über den Kernen des proximalen Tubulus mit Lysosomen ebenfalls mit einer Signifikanz von 95.45 % gegenüber den unveränderten Tubuluszellen erhöht ist.

Zusammenfassend läßt sich also für die Gesamtzelle feststellen, daß mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit eine Steigerung der Proteinsynthese in den Zellen

des proximalen Tubulus unter den Bedingungen der Dauerinfusion und des Durstversuches zu erwarten ist. Die Syntheseleistung in der HENLE-schen Schleife scheint nur durch die Dauerinfusion angeregt zu werden.

Die unbehandelten Diabetes insipidus - Tiere mit und ohne Tegretal (Gruppe IIa,b) unterscheiden sich nicht von der Long Evans - Kontrollgruppe.

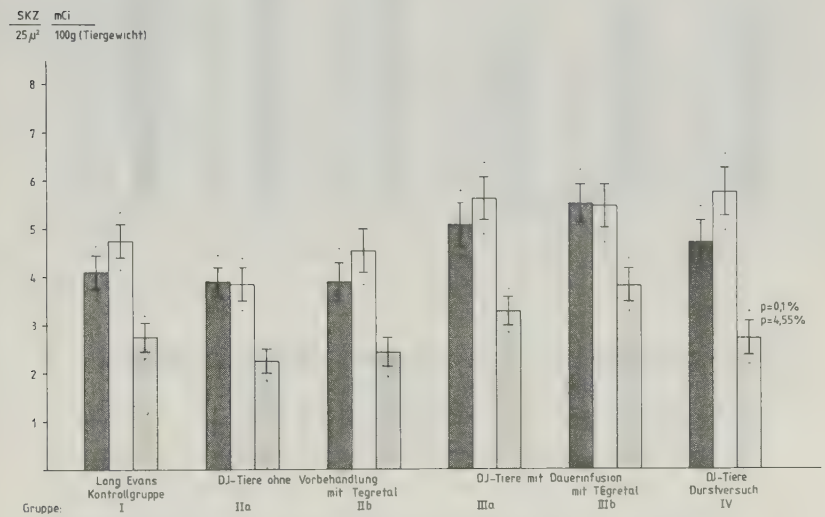


Fig. 9 :

Mittelwertvergleich der Silberkorndichten im Cytoplasma für den
- prox. Tub. ohne Lysosomen
- prox. Tub. mit Lysosomen
- und die HENLE-sche Schleife

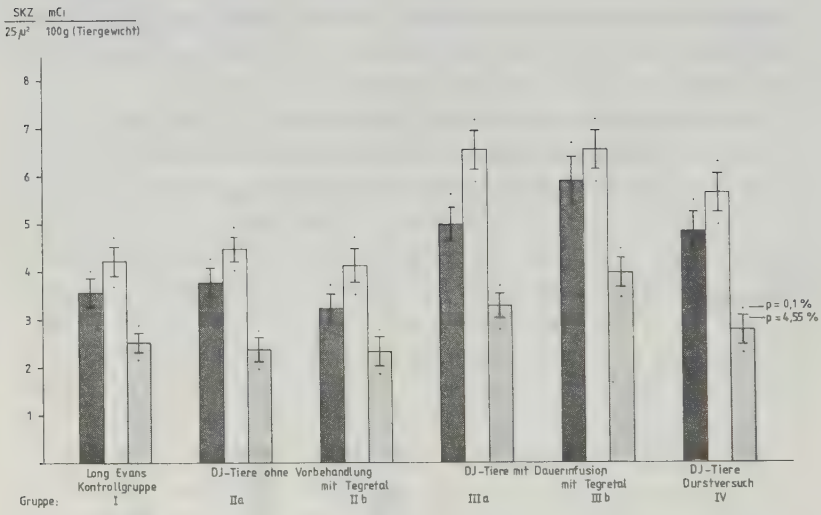


Fig. 1o :

Mittelwertvergleich für die Silberkorndichten im Kern für den
- prox. Tub. ohne Lysosomen
- prox. Tub. mit Lysosomen
- und die HENLE-sche Schleife

VII. Vergleich der Inkorporationsraten über Cytoplasma und Kernen

Im Abschnitt (III und) IV war das unterschiedliche Verhältnis der Aminosäureinkorporation von Cytoplasma zu Kern unter den verschiedenen Versuchsbedingungen aufgefallen. Deshalb errechneten wir den Quotienten aus der mittleren SKD in Cytoplasma und Kern ($SKD_{korr.\ cyt.}/SKD_{korr.\ kern}$) für alle Versuchstiere (Tab. 8) und die gesamten Versuchsgruppen.

	Tubulus ohne Vakuolen	mit Vakuolen	HENLE-sche Schleife
Gruppe I (Long Evans)	1.139	1.13o	1.132
Gruppe II (ohne Vorbeh.)	1.192	1.o21	1.o23
Gruppe III (Dauerinfusion)	o.958	o.863	o.991
Gruppe IV	o.994	1.o33	1.ooo

Der unter 1 erniedrigte Quotient bei den Ratten mit Dauerinfusion bestätigt den beobachteten Trend einer vergleichsweise stärkeren Aktivität über den Kernen der Gruppe III. Innerhalb dieser Gruppe besitzen die Tubuli mit Cytoplasmaeinschlüssen die niedrigsten Quotienten.

Entsprechende Veränderungen im Bereich der HENLE-schen Schleife sind nicht so deutlich abzuleiten.

VIII. Die mittlere Kernzahl pro Blickfeld (1o ooo μ^2)

In Figur 11 ist die mittlere Kernzahl pro Blickfeld bei den verschiedenen Versuchsanordnungen dargestellt. Die etwas erniedrigte Kernzahl bei den Diabetes insipidus - Ratten ohne Vorbehandlung ist wegen der großen Standardabweichung nicht signifikant.

Vergleicht man aber die beiden Mittelwerte aus allen Versuchstieren für den Tubulus mit und ohne Vakuolen, so findet man in den veränderten Tubulusabschnitten mit durchschnittlich 38 $\pm$ 8.6 gegenüber dem normalen Tubulus mit 57 $\pm$ 9.5 Kernen/Planquadrat eine eindeutig erniedrigte Kerndichte (vgl. Tabelle 9).

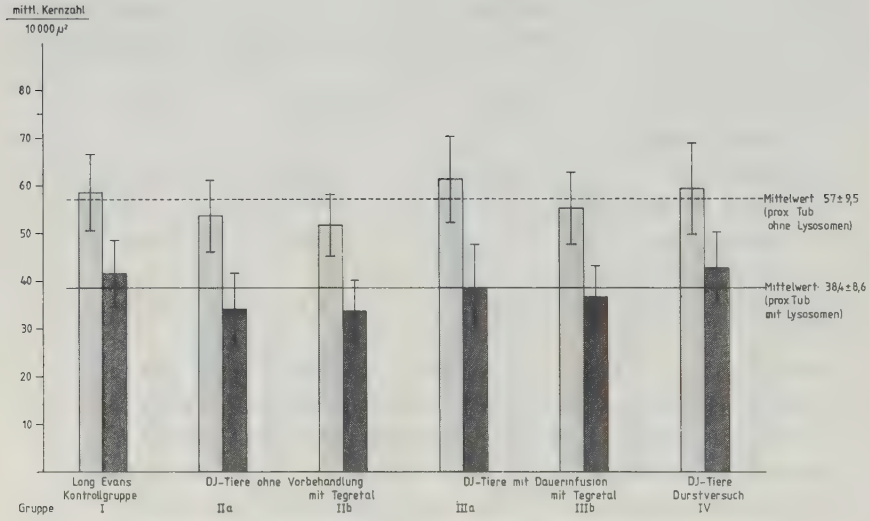


Fig. 11 :

Vergleich der Kerndichte der Rindenschicht

□ im prox. Tub. ohne Lysosomen

■ im prox. Tub. mit Lysosomen

IX. Aktivitätsmessungen

Die TriCarb - Aktivitätsmessungen führten für die Niere und die Referenzorgane Leber und Herz zu folgenden Ergebnissen (Figuren 12 bis 14; die Werte der Kontrollgruppen wurden = 1 gesetzt).

a) Niere

Die höchsten Aktivitäten finden sich in den Nieren der Gruppe III (Dauerinfusion). Der Q - Wert (vgl. Abschnitt Berechnungen, 1) beim Durstversuch ist zwar niedriger als in Gruppe III, aber höher als der der Kontrollgruppe und der Tiere der Gruppe II ohne Tegretal.

Die letzteren weisen eine geringere Aktivität als die Long Evans - Ratten auf. Sowohl in Gruppe II wie auch in Gruppe III konnte durch Verabreichung von Carbamazepin eine Impulssteigerung gegenüber den unbehandelten Tieren erzielt werden.

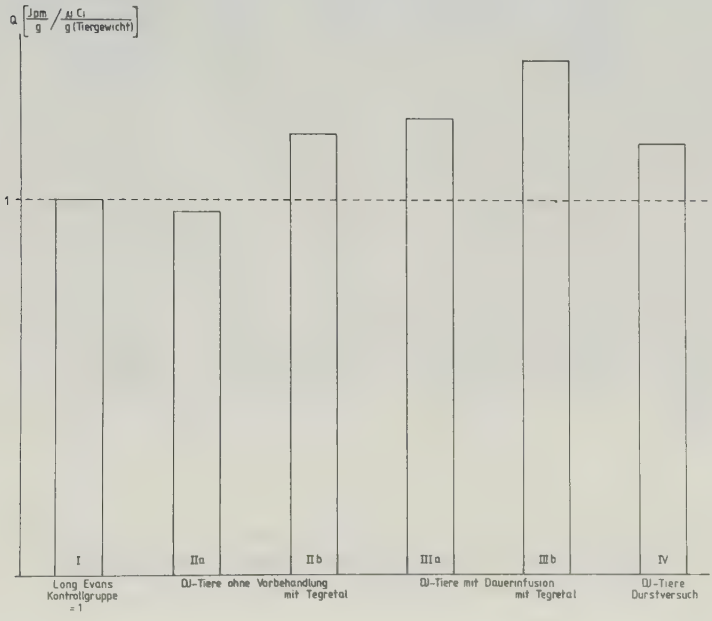


Fig. 12 :

Durchschnittlicher Q - Wert für Nierengewebe unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Kontrolle = 1)

b) Leber

Im Referenzorgan Leber ist die Aktivität bei den Tegretaltieren der Gruppe II und beim Durstversuch am höchsten. Die niedrigsten Q - Werte (< 1) besitzen die gewässerten Diabetes insipidus - Tiere, bei denen nach Tegretalgabe ebenfalls eine Aktivitätssteigerung (Q - Wert > 1) nachweisbar war.

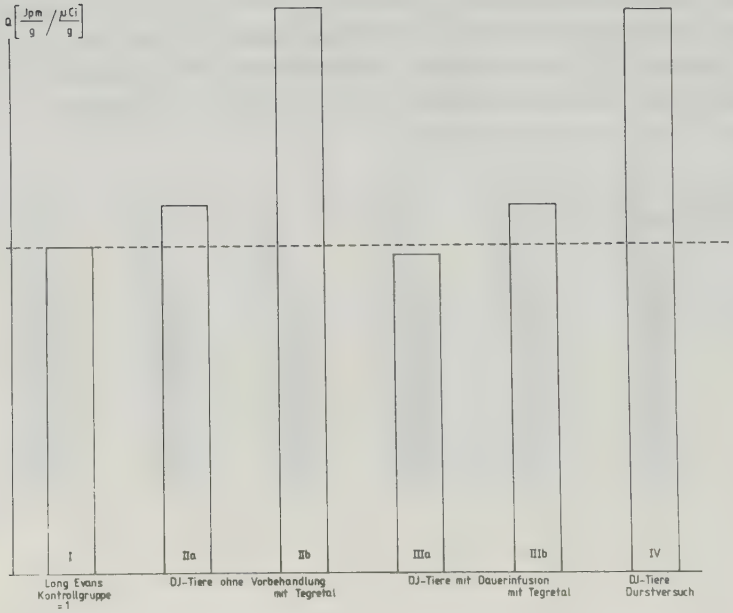


Fig. 13 :

Durchschnittlicher Q - Wert im Lebergewebe unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Kontrolle = 1)

c) Herz

Die Szintillationsmessung des Herzmuskelgewebes führte zum Säulendiagramm in Figur 14. Auch hier zeigten die Tegretaltiere der Gruppe II und III einen leichten Anstieg ihrer Aktivität. Nur bei den Ratten, die mit einer Dauerinfusion vorbehandelt worden waren, sind die Werte höher als bei den Kontrollen. Die geringste Impulszahl wurde beim Durstversuch gemessen.

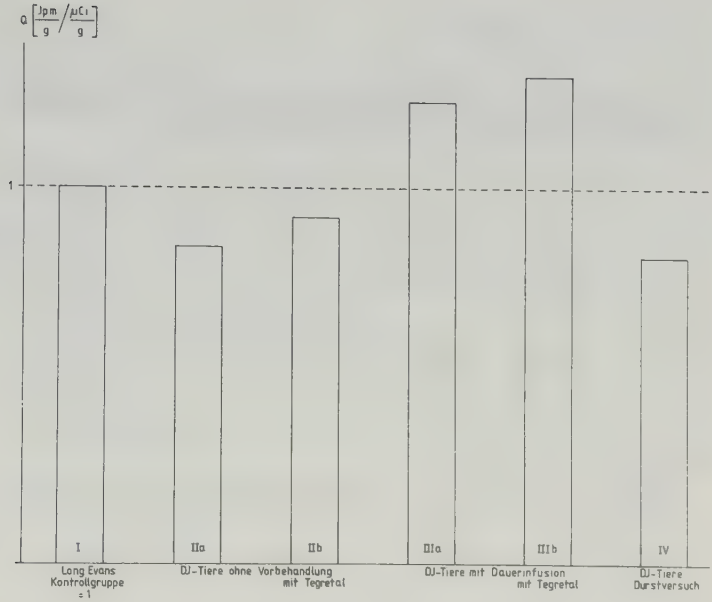


Fig. 14 :

Mittlerer Q - Wert im Herzgewebe unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Kontrolle = 1)

D. D I S K U S S I O N

I. Zur Aussagekraft der autoradiographischen Befunde nach Injektion von ^{3}H - l - Phenylalanin

Aufgrund der Ergebnisse biochemischer und autoradiographischer Untersuchungen (Lit. bei SCHULTZE, B. 1968) gilt die Schwärzungsintensität in Autoradiogrammen über den Zellstrukturen nach Injektion von ^{3}H - l - Phenylalanin als Maß für die zelluläre Aminosäureinkorporation in neugebildetes Eiweiß. Dabei wurde noch von SCHULTZE die Lokalisation der Markierung (einzelnes Silberkorn) mit dem Ort der de - novo - Synthese von Proteinmolekülen gleichgesetzt.

Neueren Untersuchungen entsprechend gelten aber die cytoplasmatischen Ribosomen und das Ergastoplasma (rauhes endoplasmatisches Retikulum) als Hauptsitz der Eiweißsynthese (BUCHER, O. 1973; NAGL, W. 1976). Obwohl der Kern 7o bis 75 % seines Trockengewichts an Proteinen, besonders Histonen und Enzymen, die vor allem mit dem Nucleotid- und Kohlehydratstoffwechsel in Beziehung stehen, enthält, ist eine nucleäre Proteinsynthese von größerem Ausmaß bisher nicht nachgewiesen. Deshalb müssen Markierungen über den Kernen unter dem Aspekt der Einschleusung von aktiven Eiweißmolekülen aus dem Cytoplasma betrachtet werden.

Der Schluß, daß die inkorporierte Aminosäureaktivität generell ein Maß für die Aminosäureumsatzrate (Menge/Zeit) ist, darf jedoch nur dann gezogen werden, wenn die mittlere spezifische Aktivität (s_{mittel}) des freien Phenylalanins (= Tritiumaktivität pro Mengeneinheit an freiem Phenylalanin) am " Ort der Eiweißsynthese " innerhalb des Organismus eines Tieres überall denselben Wert hat.

$$\text{in EW eingebautes Tritium-1-Phenylalanin zwischen Injektion und Tötung} \Big|_{0\ \text{min}}^{60\ \text{min}} = A_o \cdot \int_{0}^{60\ \text{min}} s_t \cdot dt = A_o \cdot s_m \cdot 60\text{min}$$

Dabei gilt:

A_o = pro Zeiteinheit in EW inkorporierte Menge an freiem Phenylalanin

s_t = spezifische Aktivität der freien Aminosäure

s_m = s_{mittel}

Wenn das Integral für alle Versuche als konstant betrachtet werden kann, ist die erhaltene Silberkorndichte der gesuchten Aminosäureumsatzrate (A_o) direkt proportional (MÜLLER, D., MAURER, W. 1965; CITOLER, P., CITOLER, K. et al. 1966; Lit. bei SCHULTZE, B. 1968). Um festzustellen, ob sich der Pool, und damit die spezifische Aktivität des freien Phenylalanins infolge der verschiedenen Versuchsanordnungen ändert, mußten wir Studien in Form von Tritiumaktivitätsmessungen mit dem Szintillationsspektrometer an den Referenzorganen Leber und Herz durchführen. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Messungen vom Lebergewebe, so kann man die von den Kontrolltieren abweichenden Befunde (Figur 13) folgendermaßen erklären:

a) Die erhöhten Aktivitäten bei den mit Carbamazepin behandelten Tieren werden möglicherweise durch die, zum Abbau und zur Entgiftung des Medikaments in der Leber notwendige Steigerung des Leberstoffwechsels verursacht (vgl. REMMER, H. 1972).

b) Die sehr hohen Impulszahlen beim Durstversuch und die leicht erhöhten Werte der Ratten aus Gruppe II (Futter und Wasser ad libitum) könnten die Folge eines aktivierten Renin - Angiotensin - Mechanismus sein.

Eine ausführliche Diskussion der gesteigerten Leberaktivität unter bestimmten Versuchsbedingungen findet

sich bei HÖRING, E. (198o) und FIRSCHING, W. (1979).

Auch die Befunde der TriCarb - Messungen des Herzgewebes sind verständlich. So bedingt die Hypovolämie bei den Brattleboro - Ratten der Gruppen II und IV eine verschlechterte Sauerstoffversorgung des besonders hypoxieempfindlichen Herzmuskels und damit eine Reduktion des Zellstoffwechsels. Bei den überwässerten Tieren kommt es zu einer Volumenbelastung des Herzens. Diese führt in Zusammenwirkung mit der Zufuhr ausreichender Mengen an Energieträgern (Glucoseinfusion !) zur gesteigerten Eiweißsynthese in den Herzmuskelzellen.

Wie bei den Leberpräparaten findet sich eine verstärkte Tritiumaktivität bei den Tegretaltieren. Hierfür bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an. So könnte ein osmotischer Effekt der in hoher Dosis (1oo mg/kg Körpergewicht/Tag) verabreichten Carbamazepinmoleküle bzw. resorbierter Teilchen der CMC - Lösung (vgl. S. 6) einen geringen intravasalen Volumenzuwachs mit Rückwirkung auf die Herzarbeit bedingen. Andererseits ist eine Erniedrigung des freien Aminosäurepools durch das Medikament nicht mit Sicherheit auszuschließen. Da diese Frage mit unseren Methoden nicht endgültig geklärt werden kann, muß bei der Interpretation der Tritiummessungen und Autoradiogramme der Nieren dieser Aspekt im Auge behalten werden. Die sehr geringen Differenzen der Q - Werte dürfen aber auch nicht überbewertet werden, da sie sich im Rahmen der statistischen Streuungsbreite befinden.

Indem sich also die, im Vergleich zu den Kontrolltieren veränderten Tritiumaktivitäten für einzelne Versuchsgruppen bei den Referenzorganen Leber und Herz aus der unterschiedlichen Belastung dieser Organe durch die entsprechenden Versuchsanordnungen ableiten lassen, scheinen die Poolverhältnisse des endogenen Vorläufers unter den verschiedenen Bedingungen (mit Ausnahme vielleicht der Carbamazepinapplikation) im Wesentlichen

gleich zu bleiben. Man kann deshalb annehmen, daß der exogen zugeführte tritiierte Vorläufer im Organismus aller Tiere gleichförmig verdünnt, und zur örtlichen Neubildung von Eiweiß pro Gewichtseinheit in quantitativ gleichem Maße verwendet wurde. Damit ist das Ausmaß der Schwärzung im Autoradiogramm einer proportionalen Änderung der Syntheserate korreliert. Die Brattleboro - Ratten können somit direkt mit den Long Evans - Kontrolltieren verglichen werden.

Bei der Gegenüberstellung der Aktivitäten über Kern und Cytoplasma muß das Phänomen der ß - Selbstabsorption berücksichtigt werden (Lit. bei SCHULTZE, B. 1968). Nach den grundlegenden Arbeiten von MAURER und PRIMBSCH (1964) ist die Korndichte in Autoradiogrammen nur bei kleinsten Schnittdicken $< 1\ \mu$ ein Maß für die Tritiumaktivität pro Volumeneinheit. Bei dickeren Schnitten nimmt die SKZ/μ^2 für die betreffenden Zellstrukturen (Kern, Nucleolus, Cytoplasma) wegen der verschiedenen ß - Selbstabsorption unterschiedlich stark zu, bis bei ca. $3\ \mu$ eine " Sättigungsdicke " erreicht ist, ab der die Silberkorndichte praktisch konstant bleibt. Die Korndichte ist dann aber ein Maß der Aktivität pro Gewichtseinheit der Trockenmasse, so daß zur genauen quantitativen Auswertung der Autoradiogramme die Masse/cm^2 der einzelnen Zellstrukturen bekannt sein muß. Für die Bewertung unserer Versuche war es wichtig zu wissen, daß die Trockenmasse, und damit die ß - Selbstabsorption des Cytoplasmas größer als die des Kerns ist. Auch sind hinsichtlich der Massenbelegung im Cytoplasma sicherlich stärkere Differenzen zwischen den Tubuli mit Vakuolen und den unveränderten Tubuli gegeben, welche mit dem Auftreten von Lysosomen im Zelleib zusammenhängen dürften. Die Bestimmung der reinen Cytoplasmafläche außerhalb der Einschlüsse war aus methodischen Gründen nicht möglich.

II. Die caryoplasmatische Aktivitätsinkorporation

Wie bereits erwähnt, ist man heute der Auffassung, daß sich die zelluläre Proteinsynthese ausschließlich an den Polysomen des Cytoplasmas abspielt. (Trotzdem sollte nach der Meinung einiger Autoren (Lit. bei DAVID, H. 197o und NAGL, W. 1976) die Möglichkeit einer Eiweißsynthese im Kern diskutiert werden.) Die Silberkornmarkierungen über dem Kern müssen daher auf aktive Eiweißmoleküle, welche aus dem Cytoplasma eingeschleust wurden, zurückzuführen sein.

STÖCKER, E., ALTMANN, H.-W. (1963) und STÖCKER,E. (1964) hatten bei zeitlich gestuften Untersuchungen von Leberzellen TAA - gefütterter Ratten innerhalb einer radioaktiven Versuchszeit von 6o Minuten keine wesentliche Veränderung der nucleären und cytoplasmatischen Schwärzungsrelation beobachtet. Sie schlossen daraus, daß es (in dieser Zeit) keine Migration von Eiweiß aus dem Kern in das Cytoplasma und dementsprechend eine eigene caryo- und cytoplasmatische Proteinsynthese gebe. Neuere elektronenmikroskopische Aufnahmen (Lit. bei NAGL, W. 1976) erbrachten aber zahlreiche Hinweise dafür, daß Moleküle aus dem Cytoplasma die Kernhülle auf verschiedenen Wegen passieren können und Kernmaterial in das Cytoplasma abgeschnürt wird. Nimmt man nun eine " gleichberechtigte " nucleo - cytoplasmatische Wechselwirkung an, bei der in Art eines " steady - state " der sofortige Transport von im Cytoplasma neugebildeten Eiweißmolekülen in den Kern stattfindet, so ist die von ALTMANN und STÖCKER beschriebene konstante Schwärzungsrelation über beiden Zellkompartimenten verständlich.

Trotz der engen Verzahnung der zellulären Stoffwechselprozesse wollen wir zunächst nur untersuchen, auf welche Weise sich der Kern verschiedenen Aktivitätszuständen anpassen kann. Hierfür gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

a) Die Tritiumaktivität pro Volumeneinheit bleibt konstant und eine veränderte Stoffwechselaktivität äußert sich in einer Größenzu- bzw. -abnahme des Kerns mit entsprechender Zu- bzw. Abnahme der Silberkornzahl pro Gesamtkern.

Diese Proportionalität von SKZ/Kern und Kernvolumen wurde von CITOLER, P., CITOLER, K. et al. (1966) beschrieben und schon von HEMPEL, K., LENNARTZ, K.-J. und MAURER, W. (1962) bei den Zellen experimentell pathologisch veränderter Tiere gefunden.

b) Der Kern könnte aber auch seine Aktivität pro Volumeneinheit ohne maßgebliche Veränderung des Gesamtvolumens verschiedenen Stoffwechselzuständen anpassen.

Nach unseren Beobachtungen scheint der Kern von beiden Möglichkeiten Gebrauch zu machen. So ist aus Figur 2 ersichtlich, daß die Kerne der lysosomenüberladenen proximalen Tubulusabschnitte einen größeren mittleren Durchmesser aufweisen als die der relativ lysosomenarmen Tubuluszellen. In den Tubulusepithelien mit vielen Einschlüssen ist aber auch eine größere SKZ/Kern zu finden (Figur 1). Andererseits wird die Kerngröße innerhalb der einzelnen Nephronstrukturen (proximaler Tubulus mit vielen bzw. wenigen Lysosomen und HENLEsche Schleife) durch die verschiedenen Versuchsbedingungen nicht eindeutig beeinflußt (Figur 2).

Bedenkt man die relativ konstanten Kerndurchmesser, so fällt bereits in Figur 1 eine erhöhte SKZ/Kern bei Dauerinfusion und Durstversuch auf. Deutlich wird die Aktivitätssteigerung pro Volumeneinheit bei den genannten Versuchsgruppen vor allem durch die Gegenüberstellung der mittleren korrigierten Silberkorndichten (Figuren 3, 4, 5 und 7). Dieser Trend betrifft alle drei untersuchten Tubulusabschnitte.

Ein auffälliges Verhalten findet man bei den Kernen der HENLE-schen Schleife. Zum einen ist hier der mittlere Kerndurchmesser deutlich größer als im proximalen Tubulus (7.1 μ gegenüber 6.4 bzw. 6.7 μ; vgl. Tabelle 3),

zum anderen weisen diese Kerne aber eine geringere Aminosäureinkorporationsrate auf. Ein einfacher Größenvergleich aller Epithelzellen des einen Organs Niere zur Beurteilung der zellulären Proteinsynthese im Sinne von CITOLER, P., CITOLER, K. et al. (1966) ist demnach nicht möglich. Trotzdem findet sich gerade bei dieser Zellgruppe ein Befund, der der von CITOLER, P., CITOLER, K. et al. (1966) postulierten Kernvolumen - Aktivitäts - Korrelation entspricht. Die in Versuchsgruppe II gegenüber allen anderen Gruppen um ca. 23 % kleineren Kerne der HENLE-schen Schleife (Figur 2) haben nämlich eine entsprechend niedrigere Gesamtsilberkornzahl, so daß die Aktivität pro Flächeneinheit unverändert bleibt (vgl. Figur 5).

III. Die cytoplasmatische Aktivitätsinkorporation

Für eine Anpassung des cytoplasmatischen Stoffwechsels an verschiedene " Umweltbedingungen " stehen auch dem Zelleib die Möglichkeiten der Aktivitätssteigerung pro Volumeneinheit und der Aktivitätssteigerung durch Volumenvermehrung zur Verfügung. Wie der Kern dürfte sich das Cytoplasma beider Mechanismen bedienen.

a) Für die Stoffwechselsteigerung durch Zellschwellung sprechen unsere Befunde der Kernzählung pro Blickfeld beim proximalen Tubulus (Figur 11).

Grundlage für diese Untersuchung war die Annahme, daß sich eine Vergrößerung der Tubulusepithelzellen in einer Abnahme der Zell- und damit der Kernzahl pro definierter Fläche äußert. Beim Vergleich der lysosomenüberladenen Tubuli mit normalen proximalen Tubulusabschnitten fiel die signifikante Erniedrigung der Kernzahlen bei den erstgenannten Strukturen auf. Die stark phagosomenhaltigen Zellen befinden sich nun aber vorwiegend in der pars contorta des proximalen Tubulus, welcher bekanntlich einen intensiveren Stoffwechsel besitzt als die pars recta des proximalen Tubulus.

Wie im letzten Kapitel dargelegt, fanden wir in diesen Epithelzellen auch eine Vergrößerung des Kernvolumens. Dieser Befund bestätigt die Beobachtungen von CITOLER, P., CITOLER, K. et al. (1966) und SCHULTZE, B. (1968), welche eine relativ gleiche Schwärzungsverteilung pro Flächeneinheit über Kern und Cytoplasma, sowie eine Proportionalität zwischen Kernvolumen und cytoplasmatischer Syntheserate bzw. Cytoplasmavolumen beschreiben.

Für die verminderte Kerndichte könnte aber auch eine Verdrängung und Aufblähung der Epithelzellen durch die fast markierungsfreien Vakuolen mitverantwortlich sein.

b) Wie aus Figur 11 ersichtlich ist, wurde die Zellgröße durch die verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant beeinflußt. Es gibt jedoch deutliche Hinweise dafür, daß die Aktivität pro Flächeneinheit bzw. Volumeneinheit durch die Hyperhydratation (Gruppe III) und Exsikkose (Gruppe IV) der Diabetes insipidus - Ratten gesteigert wird. Die cytoplasmatische Silberkorndichte ist in den Figuren 3, 4, 5 und 6 für die genannten Versuche höher als bei den Kontrolltieren und unbehandelten Diabetes insipidus - Tieren (Gruppen I und II) und verhält sich somit gleichsinnig wie die Silberkorndichte über den Kernen. Diese gemeinsamen Tendenzen sollen daher in den folgenden Kapiteln für die Gesamtzelle ohne Differenzierung von Cytoplasma und Caryoplasma diskutiert werden.

c) Vergleicht man die cytoplasmatische mit der caryoplasmatischen Silberkorndichte, so kann man - unter Berücksichtigung der größeren β - Selbstabsorption im Cytoplasma (vgl. Kapitel D/I) - aussagen, daß die cytoplasmatische Aminosäureinkorporation pro Volumeneinheit im Rahmen der statistischen Schwankungsbreite annähernd konstant größer ist als die caryoplasmatische (SKD_{cyt} / $SKD_{kern} \geq 1$; vgl. Figuren 3, 4, 5 und Tabellen 4 und 5). Dies spricht für einen, selbst unter verschiedenen Versuchsbedingungen sofort einsetzenden, proportionalen Proteintransport vom Zelleib in den Kern.

Auffallend ist die Verschiebung der Aktivitätsrelation zugunsten des Kerns in den vakuolär veränderten Tubuli unter dem Einfluß der Hyperhydratation (Figur 4; Tabellen 4 und 5; SKD_{cyt} / SKD_{kern} < 1). Dies könnte in folgendem methodischen Fehler begründet sein: Da die Phagosomen nur vereinzelte Silberkörner aufweisen und bei der Auswertung nicht von der übrigen Cytoplasmafläche abzutrennen waren, könnte ihr unterschiedlicher Anteil an der untersuchten Gesamtfläche die Silberkorndichte negativ beeinflußt haben. Dem steht gegenüber, daß sich der systematische Fehler bei allen Tieren in gleicher Weise hätte auswirken müssen. Auch ist die Verschiebung der Aktivitätsrelation durchaus keine neue Beobachtung. CITOLER, P., CITOLER, K. et al. (1966) beschrieben eine abnehmende Tendenz des Verhältniswertes $SKZ_{gesamt-cyt}$ / SKZ_{kern} bei Zellen mit erhöhtem Stoffwechsel wie z.B. Kryptenepithelien des Darms, regenerierenden Leberzellen nach Hepatektomie oder im Buttergelb - Ca der Leber (vgl. HEMPEL,K., LENNARTZ, K.-J., MAURER, W. 1962). Nach unilateraler Nephrektomie soll in der sich kompensatorisch vergrößernden Niere der Wert von 7.8 auf 6 (bezogen auf das Gesamtcytoplasma) gesunken sein (MÜLLER, D., MAURER, W. 1965). Ganz analog trat bei uns dieses, bisher nicht sicher erklärbare Phänomen bei jener Zell- und Versuchsgruppe auf, die in den Figuren 3 bis 7 die deutlichsten Zeichen eines aktivierten Proteinstoffwechsels aufwies.

IV. Zum Einfluß der Versuche auf den Proteinstoffwechsel der Gesamtzelle

Um die Aussagekraft der gefundenen Tendenzen richtig beurteilen zu können, zogen wir einen Mittelwertvergleich (Kapitel C/VI; Figuren 9 und 1o) zu Hilfe. Nach diesem läßt sich mit über 9o % Wahrscheinlichkeit bestätigen, daß im proximalen Tubulus und in der HENLE-schen Schleife eine verstärkte Aminosäureinkorporation bei dauerinfundierten Tieren zu erwarten ist. Beim Durstversuch ist im

proximalen Tubulus eine erhöhte Inkorporationsrate mit etwas geringerer statistischer Sicherheit zu finden. Für die HENLE-sche Schleife läßt sich keine eindeutige Trendaussage machen.

a) Wodurch könnte der Proteinstoffwechsel bei der Dauerinfusion angeregt worden sein ?

Normalerweise wird durch die Infusion isotoner (5 %-iger) Glucoselösung der Extrazellulärraum nur kurzfristig stärker vergrößert, denn selbst bei sehr großen Infusionen wird die zugeführte Glucosemenge verbrannt und das entstehende freie Wasser in allen Flüssigkeitsräumen gleichmäßig verteilt (ULLRICH, K.J. 1973). Gesunde Tiere scheiden die erhöhte Wassermenge durch Hemmung der ADH - Ausschüttung über die Nieren aus, wobei eine Änderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) weder bei Normaltieren noch bei Diabetes insipidus - Ratten zu erwarten ist (Lit. bei BALMENT, R.J. et al. 1976). Da sich aber die Brattleboro - Ratten bereits unter " Normalbedingungen " (Versuchsgruppe II) im Zustand der Wasserdiurese befinden, ist die trotzdem feststellbare Zunahme des Harnvolumens nur dadurch zu erklären, daß durch die riesigen Glucoseinfusionen etwas Glucose im Urin erscheint und somit die Wasserdiurese von einer osmotischen Diurese überlagert wird (ULLRICH, K.J. 1973). Ein osmotischer Effekt der frei filtrablen Glucose tritt aber erst auf, wenn ihre Rückresorptionsrate im proximalen Tubulus ihren oberen Grenzwert erreicht und damit die Zuckerausscheidung in eine lineare Funktion der Plasmakonzentration übergeht (vgl. SIEGENTHALER, W. 1976). In diesem Fall muß dann auch, damit die Tubulusflüssigkeit isoton bleibt, die NaCl - Konzentration entsprechend der Steigerung der Glucosekonzentration immer mehr abnehmen, das heißt, NaCl muß entgegen einem immer größeren Konzentrationsgefälle aus dem Tubuluslumen herausgepumpt werden. Dies und die Zuckerrückresorption sind energieverbrauchende Zelleistungen, welche direkt oder indirekt zur erhöhten Aminosäureinkorporation bei der

Hyperhdratation beitragen können.

In neueren Arbeiten (Lit. bei HÖRING, E. 198o) wird auch diskutiert, daß sich die Diabetes insipidus - Ratten in einem permanenten Hungerzustand mit verminderter zellulärer Proteinsynthese befinden. Bei der Infusion ausreichender Flüssigkeitsmengen und Energieträger sollen die Tiere dann ihr Eiweißdefizit durch verstärkte Proteinneubildung auszugleichen versuchen.

Da sich am proximalen Tubulus vielfältige aktive und passive Sekretions- und Resorptionsprozesse abspielen, die sich darüberhinaus in schwer absehbarer Weise mit dem Stoffwechsel der Epithelzellen überlagern, bleiben unsere Interpretationsversuche für die, während der Dauerinfusion gesteigerte Eiweißsynthese weitgehend Spekulation. Dabei ist auch zu bedenken, daß die Aktivitätssteigerung nicht renalen Ursprungs sein muß, sondern ihre Ursache in der Beeinflussung extrarenaler, aber auf die Niere rückwirkender Faktoren haben kann. In diesem Sinne könnte man vermuten, daß uns unbekannte Größen die Syntheserate aller Tubulusepithelzellen, also auch der HENLE-schen Schleife unspezifisch steigern. Das gleichsinnige Verhalten der einzelnen Nephronabschnitte könnte aber auch auf eine gegenseitige Beeinflussung der Epithelien innerhalb des Organs zurückzuführen sein.

b) Ebenso schwierig sind die Verhältnisse im Nephron während des Durstversuchs zu erklären.

Obwohl die Diabetes insipidus - Ratten zu keinerlei ADH - Ausschüttung fähig sind und sich schon unter " Normalbedingungen " (Gruppe II) in einem ständigen Durstzustand befinden, wurde in zahlreichen Versuchen nachgewiesen, daß sie bei massiver Dehydratation zu einer gewissen Harnkonzentration fähig sind.

Seit der Entdeckung des Brattleboro - Stammes wurden von VALTIN, H., SCHROEDER, H.A., BERNISCHKE, K., SOKOL, H.W. (1962), VALTIN, H., SCHROEDER, H.A. (1964), VALTIN, H. (1967) und LEE, J., WILLIAMS, P.G. (1972) verschiedene Durstversuche durchgeführt. Diese Autoren

stellten nach sechs Stunden eine Reduktion des Urinflusses um 5o % einen Anstieg der Urinosmolalität bis 25o mOsmol/kg und einen Gewichtsverlust von durchschnittlich 7.5 % fest. Nach zwölf Stunden konnte eine Osmolalität von ca. 75o mOsmol/kg gemessen werden, die nach 48 Stunden Dursten langsam bis 1155 mOsmol/kg anstieg. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Plasmaosmolalität ca. 4oo mOsmol/kg, der Gewichtsverlust etwa 22 % und der Blutstickstoff war um das Fünffache erhöht. Die Natriumausscheidung war schon nach zwölf Stunden auffallend stark abgesunken. Diese verminderte Natriumausscheidung, der erhöhte Blutstickstoff und die Abnahme des Extrazellulärvolumens ist im Sinne dieser Autoren ein Argument für eine Abnahme der GFR. Im Zusammenhang mit einem relativ langsamen Flüssigkeitsstrom und der Resorption selbst geringster Wassermengen im distalen Tubulus soll es zur Diffusion von Harnstoff durch die Sammelrohre in das Interstitium von Mark und Papille mit Anstieg der interstitiellen Osmolalität kommen. Da der Diffusionskoeffizient von Harnstoff aber bei An- und Abwesenheit von Vasopressin niedriger als der von Wasser ist, kommt es auch zu einer Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Urin (Lit. bei LEE, J., WILLIAMS, P.G. 1972). LEE und WILLIAMS sind der Meinung, daß noch ein anderer Mechanismus bei der Urinkonzentration eine Rolle spielt. Sie halten nämlich das Unvermögen der Diabetes insipidus - Ratten eine hohe papilläre Natriumkonzentration aufzubauen für einen der Hauptgründe für die gestörte Harnkonzentrierung. Ein geringer Anstieg der Na - Konzentration in Mark und Papille während der Dehydratation würde demnach die Wasserresorption positiv beeinflussen. Da die Natriumkonzentration in der Nierenpapille bei Diabetes insipidus - Ratten aber trotz übermaximaler Stimulierung mit PTO (Pitressin Tannate in Oil) und 72-stündiger Dehydratation nicht die hohen Werte der Vergleichstiere erreichte, zweifeln LEE und WILLIAMS an der Normalität der Nephren bei Brattleboro - Ratten.

Leider ist nicht ausreichend bekannt, welche physiologischen Prozesse, wie z.B. eine aktive Na - Rückresorption in den verschiedenen Nephronabschnitten am Abfall der Natriumausscheidung beteiligt sind. Theoretisch können wir, wie wir das schon bei den TriCarb - Messungen der Leber getan haben, eine vermehrte Aldosteronfreisetzung (aktivierter Renin - Angiotensin - Mechanismus; vgl. Kapitel D/I) in Betracht ziehen, die die Natrium- und damit Wasserrückresorption zum Teil im proximalen, hauptsächlich aber im distalen Tubulus steigern kann. Als Argument hierfür konnten wir eine verstärkte Granulierung in den Zellen des Juxtaglomerulären Apparates nachweisen (siehe Semi - Dünnschnittbild S. 29). Der genaue Wirkungsmechanismus des Aldosterons an der Niere ist aber bis heute noch zu unklar, als daß wir mit ihm die beobachtete Steigerung der Eiweißsynthese im proximalen (!) Tubulus erklären könnten. Auch beim Durstversuch sind natürlich unbekannte intra- und extrarenale Faktoren denkbar, die die tubuläre Proteinsynthese beeinflussen.

V. Der Vergleich der verschiedenen Nephronabschnitte

1. Proximaler Tubulus und HENLE-sche Schleife

Im folgenden Abschnitt soll das Ausmaß der Aminosäureinkorporation im proximalen Tubulus mit der in der HENLE-schen Schleife verglichen werden (Figuren 6 und 7).

Schon seit langer Zeit wurde beobachtet, daß die Schwärzung von Autoradiogrammen nach Applikation von tritiiertem Phenylalanin über den Tubuli contorti der Nierenrinde wesentlich stärker als über den Glomerula und dem Mark ist (NIKLAS, A.,OEHLERT, W. 1956 und 1957; SCHULTZE, B., OEHLERT, W., MAURER, W. 196o; Lit. bei SCHULTZE, B. 1968). Diese Ergebnisse können wir insofern bestätigen, als wir bei allen Versuchen eine gegenüber der HENLE-schen Schleife gesteigerte Eiweißsynthese in

den Zellen des proximalen Tubulus vorfanden. Vergleicht man den Steigerungsfaktor der Aktivitäten (Tabelle 2), so findet man im proximalen Tubulus ohne Vakuolen eine in Cytoplasma und Kern gleichmäßig um 1.54 ± o.25 erhöhte Inkorporation und für den proximalen Tubulus mit Vakuolen eine Steigerungsrate von ca. 1.75. Die Schwankungsbreite beträgt für die Kerne des letzteren Tubulusabschnittes ± o.25, für das Cytoplasma jedoch ± o.45. Diese starke Schwankung des Cytoplasmawertes läßt sich leicht auf die bereits geschilderte Abhängigkeit der SKZ/Zählquadrat (25 μ^2) von der Größe der im Planquadrat befindlichen Vakuolen und der damit unterschiedlich großen tatsächlich ausgewerteten reinen Cytoplasmafläche zurückführen. Zu beachten ist, daß der Mittelwert trotzdem mit dem des Kerns übereinstimmt.

Die im proximalen Tubulus stärkere Proteinsynthese läßt sich zwanglos durch die vielen sich dort abspielenden aktiven Resorptions- und Sekretionsprozesse begründen. Hier wird nämlich nicht nur 7o - 8o % des filtrierten Wassers als Folge der aktiven Natriumrückresorption zurückgewonnen, sondern es findet auch der aktive Transport der filtrierten Glucose, der Aminosäuren, der Proteine, verschiedener Ionen und anderer Substanzen aus dem Lumen durch die Epithelzellen statt. Auch die Sekretion von Protonen, Paraaminohippursäure (PAH), Penizillin, Harnsäure u.a. in das proximale Konvolut stellt einen energieverbrauchenden Prozess dar (BUCHER, O. 1973; SIEGENTHALER, W. 1976).

2. Der proximale Tubulus mit und ohne Vakuolen

Sowohl aus Tabelle 2 wie aus den Figuren 6 und 7 kann man ersehen, daß der proximale Tubulus mit zahlreichen Cytoplasmaeinschlüssen eine durchwegs erhöhte Aminosäureinkorporation gegenüber dem unveränderten Tubulus besitzt. Hierbei scheinen zwei Mechanismen, nämlich eine vermehrte Eiweißresorption und eine gesteigerte Eiweißsynthese, von Bedeutung zu sein.

a) Wie beschrieben waren die Vakuolen mit Hilfe der Semidünnschnittechnik und der Elektronenmikroskopie eindeutig als Lysosomen im Sinne von DE DUVE, C. (1963) und ERIKSSON, J.L.E. (1964 und 1965) zu identifizieren (siehe S. 3o). Für ihre Entstehung kommen Prozesse der Autophagie und der Heterophagie in Frage (zu diesem Problemkreis vgl. DAVID, H. 197o und PFEIFFER, U. 1971).

Viele Eiweißresorptionsstudien (STRAUS, W. 1964; MILLER, F., PALADE, G.E. 1964; CAESAR, R. 1965; MARX, R., MOELBERT, E., ZOLLINGER, H.U. 1965; THOENES, W., LANGER, K.H., PFEIFFER, U. 1968; THOENES, W., LANGER, K.H. 1969; THOENES, W., LANGER, K.H., PFEIFFER, U., ROMEN, W. 197o) kommen zu dem Ergebnis, daß innerhalb einer Stunde (radioaktiver Versuchszeit) kaum morphologische Veränderungen an den Epithelzellen nachzuweisen sind. Da aber von der Leber sofort nach Aktivitätsapplikation markierte Eiweißmoleküle synthetisiert werden und aufgrund der physiologischen Proteinurie der Ratten im Tubulusharn erscheinen, stehen sie den Epithelzellen sofort zur Resorption zur Verfügung.

In der ersten Stunde läuft nur die " schnelle " Endocytosephase der Eiweißresorption ab, bei der sehr kleine Vesikel (o.1 - o.2 μ Durchmesser) im apikalen Zellbereich entstehen. Diese kleinen Vesikel sind lichtmikroskopisch nicht differenzierbar, so daß autoradiographische Markierungen nicht in solche Tröpfchen lokalisiert werden können.

Die vakuoläre Phase mit langsamer Wanderung der sich vergrößernden Tropfen an die Zellbasis ist erst 9o bis 12o Minuten nach Versuchsbeginn (Resorptionsbeginn) zu erwarten. Dementsprechend können die von uns beobachteten sehr großen und auch basal gelegenen Cytoplasmaeinschlüsse nur aus der " langsamen Vakuolphase " stammen und auch noch kein resorbiertes, markiertes Eiweiß enthalten. Dafür sprechen auch die nur vereinzelten Markierungen über den Vakuolen, die eine Folge von seitlich einschießenden β - Teilchen oder des Nulleffekts sein können.

Eine durchaus plausible Erklärung für die erhöhte Silberkorndichte über dem Cytoplasma wäre demnach in der sofort einsetzenden, im Vergleich zu den unveränderten Tubuli offensichtlich erheblich gesteigerten Resorption markierter Eiweißmoleküle im apikalen Zellbereich zu finden. Aus dem konstant bleibenden SKD_{cyt} / SKD_{kern} - Quotienten müßte man dann aber folgern, daß bei vermehrter Eiweißaufnahme in die Zelle auch eine vermehrte Diffusion von Proteinen in den Kern zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes stattfindet. Hiermit könnte man vielleicht auch den vergrößerten Kerndurchmesser begründen.

b) Andererseits stützt aber gerade die Konstanz des obigen Quotienten und die Vergrößerung der Kerne die Vermutung, daß in den Zellen mit vielen Phagolysosomen eine Veränderung des Zellstoffwechsels mit erhöhter Eiweißsynthese eingetreten ist. Alle Vermutungen darüber, um welche Art von Protein es sich handeln könnte, wären an dieser Stelle spekulativ. Bei dem Vergleich mit den " normalen " Tubulusepithelzellen ist auch die veränderte Massenbelegung und damit alterierte β- Selbstabsorption der vakuolären Epithelien zu bedenken. Da aber innerhalb der Vakuolen keine Aktivität nachweisbar ist und sich im Restcytoplasma offensichtlich eine, zumindest die Cytoplasmaverdrängung kompensierende Synthesesteigerung (pro Flächeneinheit) abspielt, scheint die Gesamtsyntheseleistung der Zellen nicht beeinträchtigt zu sein. Dies ist bei der Beurteilung der Ursachen einer solchen, zum Teil exzessiven Phagolysosomenbildung von Bedeutung.

Die Existenz so vieler und großer Resorptionstropfen ist bei dem geringen Alter der untersuchten Brattleboro-Ratten (nicht älter als sechs Monate) nicht selbstverständlich. Inwieweit die vakuolären Veränderungen bei den Long Evans - Tieren altersbedingt sind, läßt sich retrospektiv nicht mehr feststellen. Die frühzeitige Vakuolen-

bildung kann demnach sowohl eine Eigenheit der Diabetes insipidus - Ratten, als auch der gesamten untersuchten Long Evans - Zuchtreihe sein. Vielleicht ist sie aber auch auf exogene Faktoren zurückzuführen, die beide Tiergruppen in gleicher Weise betrafen. Die Tubulusveränderungen waren bei den Einzeltieren in individuell verschieden starkem Ausmaß ausgeprägt.

In Übereinstimmung mit den oben zitierten Autoren fanden auch wir die bevorzugte Ausbildung von Lysosomen im Bereich des stofftransportaktiven proximalen Konvoluts in der äußeren Rindenschicht und weniger in der pars recta des proximalen Tubulus.

Das Auftreten von hyalinen Tropfen wird bereits seit RANDERATH, E. (1937) und ZOLLINGER, H.U. (195o) nicht mehr ausschließlich als Zeichen der Degeneration, sondern als Zeichen der Speicherung (bei einem Überangebot) von Eiweiß, Lipiden, Cholesterin und anderer Stoffe betrachtet. Aber auch bei anderen pathologischen Einflüssen wurden vermehrte Cytoplasmavakuolen beobachtet. So beschreiben STAEMMLER, M. (1957) und CAESAR, R. (1965) im Verlauf der Viomycin - Nephrose eine hyalin - tropfige Speicherung; CAIN, H., FAZEKAS, S . (1963) und WARNIG, A., THOENES, W. (1971) berichten über apikale Blasenbildung und Eiweißtropfen in Tubulusepithelien wenige Sekunden nach experimenteller Nierenischämie und CAIN, H., KRAUS, B. (1972) fanden lysosomale Pigmentablagerungen in den Nieren alter (ab 18. bis 2o. Lebensmonat) Wistarratten. Besonders die Arbeit von CAIN und KRAUS zeigt interessante Aspekte zur Entstehung von Pigmentablagerungen und starker Phagolysosomenbildung. Sie führen folgende theoretisch möglichen Ursachen für die Bildung von Lipofuszintropfen (welche zu den Lysosomen zählen) an:

- Alternsprozesse (" Verdauungsinsuffizienz " der Lysosomen mit vermindertem Abbau)
- Speicherung infolge Fermentdefektes
- zelltoxische Schäden
- Zellüberladung bzw. -überlastung bei einem Überangebot abzubauender Substanz

Sowohl licht- wie elektronenmikroskopisch finden sich viele Ähnlichkeiten zwischen den Nieren der alten Wistarratten und der Brattleboro - Ratten. Makroskopisch ist ihnen auch die dunkelbraune Farbe gemeinsam, jedoch läßt das, im Gegensatz zu den Brattleboro - Ratten erhöhte Nierengewicht und die Nierenvergrößerung der Wistarratten auch an eine verschiedenartige Pathogenese der Tubulusveränderungen denken. Eine frühzeitige Niereninsuffizienz bei den Brattleboro - Ratten aufgrund der enormen Flüssigkeitsausscheidung mit Harnrückstau im Tubulussystem und Dilatation der Tubuluslumina wäre durchaus zu diskutieren. Außerdem ist seit langem bekannt, daß Lipofuszin nicht nur im alternden Organismus, und hier vorzugsweise mit niedriger oder fehlender Regeneration gehäuft auftritt, sondern auch in einzelnen Organen jüngerer Individuen, die einer starken Überlastung ausgesetzt sind, vorübergehend oder dauernd vermehrt zu finden sein kann (Lit. bei CAIN, H., KRAUS, B. 1972).

Sehr ähnliche histomorphologische Veränderungen der Nierenparenchymzellen sind seit langem bei der (in unserem Fall sekundären) hypokalämischen Nephropathie beobachtet worden.

Das Nebeneinander von Tubuli mit großen Phagolysosomen und solchen mit geringerer Anzahl könnte entsprechend den Ausführungen von STRAUS, W. (1964) dadurch erklärbar sein, daß es sich um verschiedene Segmente des proximalen Tubulus handelt, oder daß wegen der unterschiedlichen GFR und Proteinurie der Einzelnephren (vgl. SIEGENTHALER, W. 1976) das Eiweißangebot an die einzelnen Tubuli unterschiedlich ist.

VI. Die Aktivität der Gesamtniere

Da sich die Aminosäureinkorporation in den drei ausgewerteten Nephronabschnitten bei allen Tieren und unter allen Versuchsbedingungen gleichsinnig verhielt, ergab die Berechnung eines Aktivitätsmittelwertes über diesen drei Tubulusstrukturen keinen neuen Trend des Proteinstoffwechsels (Figur 8). Der Vergleich mit den TriCarb - Messungen (Figur 12) sollte unsere autoradiographischen Ergebnisse unterstützen und bestätigen. Die beiden Säulendiagramme entsprechen sich aber in einem Punkt nicht. Während bei den Autoradiogrammen keine Synthesesteigerung durch Tegretalverabreichung nachzuweisen ist, zeigen die mit Carbamazepin behandelten Tiere bei den Messungen mit dem Szintillationsspektrometer eine Aktivitätssteigerung. Die wirkliche Ursache für diese Differenz läßt sich schwer herausfinden, jedoch bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten an, die wohl auch zusammenwirken können. So muß man die methodisch bedingte Schwankungsbreite der TriCarb - Messungen bedenken, wobei einmal mehr Rinde, ein anderes Mal mehr Markgewebe verascht worden sein kann. Da Rinde und Mark aber verschieden stark markiert werden, wäre eine bekannte prozentuale Zusammensetzung der gemessenen Gewebsstücke für die genaue, quantitative Vergleichbarkeit notwendig. Wie wir gesehen haben, lassen sich aber selbst innerhalb der Rinde Unterschiede für die Areale mit und ohne lysosomenüberladenen Tubulusepithelien nachweisen.

Eine weitere Einschränkung der Vergleichbarkeit der Figuren 8 und 12 ergibt sich aus der Tatsache, daß mit den Autoradiogrammen nur zwei bis drei Nephronabschnitte ausgewertet werden konnten, während die Aktivitäten im TriCarb einen Mittelwert für alle Nierenzellen darstellen. Es ist daher die Möglichkeit gegeben, daß wir mit der Silberkornzählung die Strukturen, in denen Tegretal vielleicht eine Proteinsynthese induziert, nicht erfaßt

haben.

Schließlich bleibt noch einzuräumen, daß Tegretal eventuell doch den Aminosäurepool beeinträchtigt. Diese Frage wurde bereits bei der Beurteilung der Messungen von Herzgewebe diskutiert und ist nun auch durch die Nierenwerte nicht auszuschließen. Die Wirkungslosigkeit von Carbamazepin sowohl beim renalen als auch beim zentralen Diabetes insipidus der Brattleboro - Ratten (TIETZE) läßt keine direkte Beeinflussung der Nephronzellen erwarten. Andererseits erwähnt TIETZE, H.U. (1973 b), daß unter Carbamazepinbehandlung vereinzelt Knochenmarksdepressionen beobachtet wurden, so daß eine toxische Wirkung auf die Niere diskutiert werden könnte.

Als wahrscheinlicher Trend für die ganze Niere gilt daher die Aussage, daß die Eiweißsynthese des Organs unter dem Einfluß der Überwässerung und Dehydratation angeregt wird. Berücksichtigt man noch die anfänglich beschriebene Kleinheit dieser Diabetes insipidus - Nieren (ein direkter Größenvergleich der Organe durch andere Autoren konnte von uns nicht gefunden werden), so müssen wir feststellen, daß die Syntheseleistung pro Gewichtseinheit Organgewebe gegenüber Normaltieren nicht abgenommen hat, in bezug auf das Gesamtorgan aber eine verminderte Stoffwechselleistung zu folgern ist.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß verschiedener Versuchsbedingungen sowie des Medikaments Tegretal auf den zellulären Proteinstoffwechsel der Rattenniere (proximaler Tubulus und HENLE-sche Schleife) bei an hereditärem Diabetes insipidus centralis erkrankten Tieren untersucht werden. Hierzu verwendeten wir Brattleboro - Ratten, welchen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung stand oder welche hyperinfundiert bzw. einem Durstversuch unterzogen wurden. Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden Long Evans - Ratten. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit der autoradiographischen Technik der Silberkornzählung und durch Tritiumaktivitätsmessungen von Organproben (Niere und als Referenzorgane Leber und Herz) im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer. Ausgezählt wurden die Silberkörner über Cytoplasma und Kernen des proximalen Tubulus und der HENLE-schen Schleife. Als radioaktiver Prekursor der Eiweißsynthese diente ^{3}H - 1 - Phenylalanin.

Bei der Interpretation unserer Befunde kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Gesamtniere der Brattleboro - Ratten zeigt den Trend zur Aktivierung ihres Eiweißstoffwechsels besonders unter dem Einfluß der Hyper- und Dehydratation.

2. Die untersuchten Tubulusabschnitte (proximaler Tubulus mit und ohne sehr vielen Phagolysosomen und HENLE-sche Schleife) verhalten sich bei den verschiedenen Versuchen gleichsinnig, jedoch mit verschieden hoher Aminosäureinkorporation. Die höhere Proteinsynthese des proximalen Tubulus gegenüber dem distalen Tubulus entspräche dessen höherer Stofftransport- und Stoffwechselaktivität.

3. Kern und Cytoplasma der proximalen Tubulusepithelzellen scheinen sich sowohl durch Volumenzunahme als auch durch Aktivitätssteigerung pro Volumeneinheit an eine

intensivere Stoffwechselsituation anpassen zu können.

4. Bei den Brattleboro - Ratten und Long Evans - Kontrolltieren fiel eine, im Vergleich zu anderen Rattenstämmen starke Überladung vieler Zellen des proximalen Konvoluts mit Lysosomen auf, deren Ursache nicht eindeutig geklärt werden konnte. In diesen Zellen wurde eine vermehrte Aminosäureinkorporation festgestellt, die vermutlich auf die gesteigerte Resorption markierten Proteins zurückzuführen ist. Eine Aktivierung der Eiweißsynthese in diesen Zellen ist jedoch nicht auszuschließen.

5. Im Gegensatz zu biochemischen Untersuchungen und den TriCarb - Aktivitätsmessungen läßt sich autoradiographisch ein Einfluß von Carbamazepin (Tegretal) auf die zelluläre Proteinsynthese der ausgewerteten Tubuluszellen nicht bestätigen.

6. Bei, im Vergleich zu Normaltieren etwa gleichgroßer Syntheseleistung pro Gewichtseinheit (der Niere) folgt aus der Kleinheit der untersuchten Nieren eine verminderte Proteinsyntheseleistung für das Gesamtorgan bei Brattleboro - Ratten.

F. TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1 : Mittlere Silberkornzahl pro Kern (zu Fig. 1)

		prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Gruppe I				
Tier Nr.	2852	4.55 ± 2.23	5.84 ± 2.5o	3.51 ± 1.93
	2853	4.42 ± 2.o8	5.92 ± 2.64	4.8o ± 2.24
Gruppe IIa				
Tier Nr.	286o	Hydronephrose!		
	2861	4.91 ± 2.55	6.48 ± 2.57	3.32 ± 2.o8
IIb				
Nr.	2884	4.21 ± 2.o8	5.7o ± 2.85	3.oo ± 2.oo
	2885	3.93 ± 1.73	6.21 ± 2.66	2.99 ± 1.77
Gruppe IIIa				
Tier Nr.	2868	9.21 ± 3.24	11.16 ± 3.35	6.17 ± 2.99
	2869	5.33 ± 2.48	6.95 ± 2.44	4.22 ± 2.11
IIIb				
Nr.	2876	7.54 ± 2.91	8.86 ± 3.33	6.38 ± 2.58
	2877	7.o4 ± 3.19	9.o8 ± 3.23	5.2o ± 2.24
Gruppe IV				
Tier Nr.	2892	6.35 ± 2.76	8.22 ± 2.84	4.61 ± 2.59
	2893	6.28 ± 2.75	7.97 ± 2.67	4.22 ± 2.o6

Tabelle 2 : Der mittlere Kerndurchmesser (u) (zu Fig. 2)

		prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Gruppe I				
Tier Nr.	2852	6.31 ± o.35	6.61 ± o.34	7.23 ± o.48
	2853	6.36 ± o.37	6.71 ± o.39	7.5o ± o.43
Gruppe IIa				
Tier Nr.	286o	6.31 ± o.41	6.64 ± o.39	5.52 ± o.39
	2861	6.45 ± o.37	6.79 ± o.41	6.69 ± o.38
IIb				
Nr.	2884	6.38 ± o.32	6.74 ± o.36	6.16 ± o.4o
	2885	6.31 ± o.34	6.81 ± o.38	6.6o ± o.42

	prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Gruppe IIIa			
Tier Nr. 2868	6.71 ± o.35	6.73 ± o.46	7.o2 ± o.36
2869	6.52 ± o.46	6.46 ± o.36	7.27 ± o.37
IIIb			
Nr. 2876	6.12 ± o.27	6.6o ± o.6o	7.o5 ± o.4o
2877	6.4o ± o.39	6.63 ± o.45	6.65 ± o.43
Gruppe IV			
Tier Nr. 2892	6.59 ± o.42	6.89 ± o.39	7.28 ± o.37
2893	6.37 ± o.35	6.72 ± o.46	6.94 ± o.38

Tabelle 3 : Der mittlere Kerndurchmesser (μ) der einzelnen Versuchsgruppen (zu Fig. 2)

	prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Long Evans Tiere (Gruppe I)	6.3	6.7	7.4
D.I.-Tiere ohne Vorbehandlung (Gruppe II)			
gesamt (Gruppe IIa)	6.4	6.7	6.2 (3o.6μ^2)
ohne Tegretal (Gruppe IIb)	6.4	6.6	6.1
mit Tegretal	6.3	6.8	6.4
D.I.-Tiere mit Dauerinfusion (Gruppe III)			
gesamt (Gruppe IIIa)	6.4	6.6	7.o
ohne Tegretal (Gruppe IIIb)	6.6	6.6	7.1
mit Tegretal	6.3	6.6	6.8
D.I.-Tiere im Durstversuch (Gruppe IV)	6.5	6.8	7.1
Gruppen I+III+IV	6.4	6.7	7.2 (39.7μ^2)
Gruppen I+II+III+IV	6.4	6.7	6.9

30.6 μ^2 entsprechen etwa 77 % der Fläche von 39.7 μ^2.

Tabelle 4 : Die mittlere korrigierte Silberkornzahl/μ^2 im Kern und ihre einfache Standardabweichung (zu Fig. 3 bis 7)

	prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Gruppe I			
Tier Nr. 2852	0.39 ± 0.19	0.45 ± 0.19	0.23 ± 0.13
2853	0.39 ± 0.19	0.47 ± 0.21	0.30 ± 0.14
Gruppe IIa			
Tier Nr. 2860	Hydronephrose!		
2861	0.40 ± 0.20	0.48 ± 0.18	0.25 ± 0.15
IIb			
Nr. 2884	0.37 ± 0.18	0.46 ± 0.23	0.28 ± 0.18
2885	0.36 ± 0.16	0.48 ± 0.20	0.25 ± 0.15
Gruppe IIIa			
Tier Nr. 2868	0.64 ± 0.22	0.76 ± 0.21	0.39 ± 0.19
2869	0.48 ± 0.21	0.63 ± 0.21	0.31 ± 0.16
IIIb			
Nr. 2876	0.60 ± 0.22	0.61 ± 0.22	0.39 ± 0.16
2877	0.52 ± 0.21	0.63 ± 0.20	0.36 ± 0.17
Gruppe IV			
Tier Nr. 2892	0.49 ± 0.19	0.59 ± 0.21	0.29 ± 0.16
2893	0.52 ± 0.23	0.59 ± 0.21	0.29 ± 0.14

Tabelle 5 : Die mittlere korrigierte Silberkornzahl/μ^2 im Cytoplasma und ihre einfache Standardabweichung (zu Fig. 3 bis 7)

	prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Gruppe I			
Tier Nr. 2852	0.46 ± 0.23	0.52 ± 0.24	0.29 ± 0.18
2853	0.42 ± 0.21	0.52 ± 0.24	0.31 ± 0.20

	prox. Tubulus ohne Lysosomen	prox. Tubulus mit Lysosomen	HENLE-sche Schleife
Gruppe IIa			
Tier Nr. 2860	Hydronephrose!		
2861	o.42 ± o.21	o.41 ± o.22	o.24 ± o.17
IIb			
Nr. 2884	o.42 ± o.23	o.5o ± o.27	o.28 ± o.18
2885	o.47 ± o.25	o.53 ± o.23	o.28 ± o.16
Gruppe IIIa			
Tier Nr. 2868	o.61 ± o.27	o.65 ± o.25	o.38 ± o.19
2869	o.47 ± o.26	o.55 ± o.25	o.32 ± o.19
IIIb			
Nr. 2876	o.61 ± o.21	o.53 ± o.25	o.4o ± o.19
2877	o.45 ± o.23	o.55 ± o.23	o.34 ± o.17
Gruppe IV			
Tier Nr. 2892	o.52 ± o.25	o.58 ± o.26	o.3o ± o.18
2893	o.48 ± o.25	o.64 ± o.25	o.29 ± o.18

(Die Tabellen 4 und 5 zeigen die Einzelwerte, aus denen die Säulendiagramme 3 bis 7 errechnet wurden.)

Tabelle 6 : Mittelwertvergleich für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p = o.1 % (P = o.oo1) und p = 4.55 % (P = o.o455); Cytoplasma, Silberkornzahl/25μ^2 (zu Kap. C/VI, Fig. 9)

	prox. Tubulus ohne Lysosomen p = o.1%/4.55%	prox.Tubulus mit Lysosomen p = o.1%/4.55%	HENLE-sche Schleife p = o.1%/4.55%
Gruppe I			
Tier Nr. 2852	4.31 ± o.57/o.35	4.84 ± o.59/o.36	2.72 ± o.45/ o.27
2853	3.8o ± o.49/o.3o	4.68 ± o.57/o.34	2.79 ± o.47/ o.28

	prox. Tubulus ohne Lysosomen p = o.1%/4.55%	prox. Tubulus mit Lysosomen p = o.1%/4.55%	HENLE-sche Schleife p = o.1%/4.55%
Gruppe IIa			
Tier Nr. 286o		Hydronephrose!	
2861	3.88 ± o.53/o.32	3.83 ± o.55/o.33	2.26 ± o.42/o.25
IIb			
Nr. 2884	3.66 ± o.66/o.4o	4.4o ± o.79/o.48	2.42 ± o.52/o.31
2885	4.12 ± o.72/o.43	4.7o ± o.65/o.39	2.44 ± o.47/o.28
Gruppe IIIa			
Tier Nr. 2868	6.23 ± o.74/o.45	6.64 ± o.83/o.5o	3.88 ± o.52/o.32
2869	3.92 ± o.7o/o.43	4.61 ± o.68/o.41	2.67 ± o.42/o.26
IIIb			
Nr. 2876	6.46 ± o.58/o.35	5.54 ± o.7o/o.43	4.21 ± o.52/o.31
2877	4.66 ± o.78/o.48	5.71 ± o.8o/o.48	3.5o ± o.58/o.35
Gruppe IV			
Tier Nr. 2892	4.88 ± o.76/o.46	5.41 ± o.78/o.48	2.78 ± o.53/o.32
2893	4.62 ± o.77/o.47	6.15 ± o.79/o.48	2.76 ± o.55/o.33

Tabelle 7 : Mittelwertvergleich für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p = o.1 % und p = 4.55 %; Silberkornzahl/25 u^2 im Kern (zu Kap. C/VI, Fig. 1o)

	prox. Tubulus ohne Lysosomen p = o.1%/4.55%	prox. Tubulus mit Lysosomen p = o.1%/4.55%	HENLE-sche Schleife p = o.1%/4.55%
Gruppe I			
Tier Nr. 2852	3.61±o.46/o.28	4.24±o.47/o.29	2.14±o.32/o.19
2853	3.5o±o.44/o.27	4.18±o.5o/o.3o	2.71±o.33/o.2o

	prox. Tubulus ohne Lysosomen p = o.1%/4.55%	prox. Tubulus mit Lysosomen P = o.1%/4.55%	HENLE-sche Schleife p = o.1%/4.55%
Gruppe IIa			
Tier Nr. 286o		Hydronephrose!	
2861	3.73±o.49/o.3o	4.47±o.45/o.27	2.35±o.38/o.23
IIb			
Nr. 2884	3.27±o.51/o.31	3.97±o.64/o.39	2.45±o.5o/o.3o
2885	3.14±o.44/o.27	4.23±o.57/o.35	2.18±o.42/o.26
Gruppe IIIa			
Tier Nr. 2868	6.49±o.59/o.36	7.79±o.7o/o.42	3.96±o.51/o.31
2869	3.96±o.56/o.34	5.26±o.57/o.34	2.56±o.35/o.21
IIIb			
Nr. 2876	6.37±o.87/o.53	6.47±o.61/o.37	4.o9±o.43/o.26
2877	5.4o±o.7o/o.42	6,56±o.69/o.42	3.78±o.56/o.34
Gruppe IV			
Tier Nr. 2892	4.6o±o.59/o.36	5.53±o.63/o.38	2.74±o.48/o.29
2893	4.96±o.71/o.43	5.64±o.65/o.39	2.79±o.45/o.27

Die statistische Sicherheit beträgt bei p = o.1 % 99.9 %, bei p = 4.55 % entsprechend 95.45 %.

Tabelle 8 : Der Quotient $SKD_{korr,\ cyt}$ / $SKD_{korr,\ kern}$ für die einzelnen Versuchstiere (zu Kap. C/VII)

Tier Nr.	Tubulus ohne Vakuolen/mit Vakuolen		HENLE-sche Schleife
2852	1.195	1.14o	1.265
2853	1.o87	1.125	1.o29
286o			
2861	1.o42	o.855	o.964
2884	1.12o	1.1o5	o.989
2885	1.314	1.1o8	1.121
2868	o.959	o.855	o.946
2869	o.991	o.875	o.979
2876	1.o14	o.856	1.o28
2877	o.862	o.869	o.925
2892	1.o61	o.978	1.1o3
2893	o.93o	1.o89	o.989

Tabelle 9 : Die mittlere Kernzahl pro Blickfeld (1o ooo u^2)
im proximalen Tubulus (zu Fig. 11)

		prox. Tubulus ohne Lysosomen		mit Lysosomen	
Gruppe I					
Tier Nr.	2852	57.46±7.35	58.64±7.99	39.52±7.46	41.71±7.o8
	2853	59.82±8.62		43.9o±6.7o	
Gruppe IIa					
Tier Nr.	286o	54.92±7.o5	53.62±7.27	3o.16±5.74	33.81±7.42
	2861	52.32±7.49		37.46±9.o9	
IIb					
Nr.	2884	51.o8±6.3o	51.42±6.64	33.3o±7.51	33.47±6.59
	2885	51.76±6.97		33.64±5.66	
Gruppe IIIa					
Tier Nr.	2868	66.6o±9.34	6o.83±9.o9	36.78±9.52	38.44±9.oo
	2869	55.o6±8.84		4o.1o±8.47	
IIIb					
Nr.	2876	56.12±8.2o	54.88±7.49	36.o2±6.54	36.54±6.57
	2877	53.64±6.78		37.o6±6.6o	
Gruppe IV					
Tier Nr.	2892	56.98±9.64	58.9o±9.33	37.68±7.69	42.45±7.4o
		6o.82±9.o2		47.22±7.1o	

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

AMLACHER, E. — Autoradiographie in Histologie und Zytologie. Leipzig: Thieme. 1974.

BÁLINT, P. — Normale und pathologische Physiologie der Niere. Berlin. 1969.

BALMENT, R.J., JONES, J.C., HENDERSON, I.W., OLIVER, J.A. — Effects of adrenalectomy and hypophysectomy on water and electrolyte metabolism in male and female rats with inherited hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain). J. Endocrinol. 71 (1976). 193 - 217.

BLÜMCKE, S., BACKMANN, R. — Epon 812 als Einbettungsmittel für lichtmikroskopische Autoradiographie. Naturw. 53 (1966). 362.

BÖRNER, E. — Untersuchungen über die klinische Bedeutung des antidiuretischen Hormons. Annales Universitatis Saraviensis Medizin. XXI (1974). 1 - 54.

BRAUNHOFER, J., ZICHA, L. — Eröffnet Tegretal neue Therapiemöglichkeiten bei bestimmten neurologischen und endokrinen Krankheitsbildern ? Med. Welt. 36 (1966). 1875 - 1880.

BUCHBORN, E. — Nephrogener Diabetes insipidus und symptomatische ADH - Refraktärität. in : ULLRICH und HIERHOLZER, 3. Symposion der Gesellschaft für Nephrologie. Bern, Stuttgart 1964. 247 - 264.

BUCHER, O. — Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. (Bes. S. 445 - 466). Bern, Stuttgart, Wien: Huber. 1973.

CAESAR, R. Die Bedeutung der Lysosomen für die formale Genese der Viomycin-Nephrose. Verh. dtsch. Ges. Path. 49 (1965). 157 - 162.

CAIN, H., FAZEKAS, S. Studien über die Folgen einer vorübergehenden experimentellen Nierenischaemie. I. Die morphologische Veränderungen des akuten Schadens und ihre funktionelle Deutung. Virch. Arch. Path. Anat. 336 (1963). 389 - 416.

CAIN, H., KRAUS, B. Lysosomale Pigmentablagerungen in der Niere alter Wistarratten. Virch. Arch. Abt. B. 1o (1972). 322 - 338.

CITOLER, P., CITOLER, K., HEMPEL, K., SCHULTZE, B., MAURER, W. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H- und ^{14}C- Aminosäuren zur Größe des nucleären und cytoplasmatischen Eiweißstoffwechsels bei verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte. Z. Zellforsch. 7o (1966). 419 - 448.

DAVID, H. Zellschädigung und Dysfunktion. Protoplasmatolgia. X,1 . Wien, New York: Springer. 197o.

DEETJEN, P., BOYLAN, J.W. Niere und Wasserhaushalt. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg. 1976.

DICKER, S.E., ELLIOTT, A.B. Effect of neurohypophysial hormones on fluid movement across isolated bladder of rana cancrivora, rana temporaria and bufo melanostictus. J. Physiol. 21o (197o). 137 - 149.

DUVE, C. DE The lysosome. Scientific. Amer. 2o8 (1963). 64 -72.

ERICSSON, J.L.E. An electronmicroscopic and histochemical study of lysosomes in the proximal tubulues of rat kidney. J. Histochem. cytochem. 12 (1964). 8 - 9.

ders. Absorption and decomposition of homologous hemoglobin in renal proximal tubular cells. An experimental light and electronmicroscopic study. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 168 (1964). 1 - 121.

ders. Transport and Digestion of Hemoglobin in the proximal Tubule. II. Electron Microscopy. Lab. Invest. 14 (1965). 16 - 39.

FIRSCHING, W. Zur zellulären RNS- und Eiweißsynthese hypothalamischer Kerngebiete von Ratten mit hereditärem, centralen Diabetes insipidus. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Cytidin bzw. ^{3}H-l-Phenylalanin. Inaug. Diss. Würzburg.1979.

FISCHER, H.A., WERNER, G. Autoradiographie. Berlin: De Gruyter. 1971.

HEINE, W.-D. Die Zellproliferation der Niere unter normalen und pathologischen Bedingungen. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin an der Ratte. Inaug. Diss. Würzburg. 1968.

HEMPEL, K., LENNARTZ, K.-J., MAURER, W. Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweißstoffwechsel im Kern und Cytoplasma der normalen und durch Buttergelb cancerisierten Leberzelle. Beitr. path. Anat. 126 (1962). 381 - 394.

HÖRING, E. Zur zellulären Ribonuclein- und Desoxyribonucleinsäuresynthese im proximalen Tubulus der Niere bei Ratten mit angeborenem Diabetes insispidus centralis. Autoradiographische Untersuchungen mit tritiiertem Cytidin und Thymidin. Inaug. Diss. Würzburg. 198o.

LEAF, A. Membrane effects of ADH. Am. J. Med. 42 (1967). 745 - 756.

LEE, J., WILLIAMS, P.G. The effect of vasopressin (pitressin) administration and dehydration on the concentration of solutes in renal fields of rats with and without hereditary hypothalamic Diabetes insipidus. J. Physiol. 22o (1972). 729 - 743.

MARX, R., MOELBERT, E., ZOLLINGER, H.U. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Eiweißspeicherung in der Mäuseniere. Verh. dtsch. Ges. Path. 49 (1965). 167 - 173.

MAURER, W. Grundlagen der Technik des Arbeitens mit radioaktiven Isotopen. In: Hdb. d. Neurochir. I/1. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer. 1959. 547 - 658.

MAURER, W., PRIMBSCH, E. Größe der ß - Selbstabsorption bei der ^{3}H - Autoradiographie. Exp. cell. Res. 33 (1964). 8 - 18.

Mc FARLANE, D. Experimental phosphate nephritis in the rat. J. Path. Bact. 52 (1941). 17 - 24.

MILLER, F., PALADE, G.E. Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopial cytochemial study. J. Cell. Biol. 23 (1964). 519 - 552.

MORRIS, J.F., NORDMANN, J.J., DYBALL, R.E.J. Structure - function correlation in mammalian neurosecretion. Int. Rev. Exp. Path. 18 (1978). 71 - 75.

MÜLLER, D., MAURER, W. Autoradiographische Untersuchungen über den Eiweißstoffwechsel der Niere bei der Ratte nach Nephrektomie. Beitr. path. Anat. 131 (1965). 121 - 136.

NAGL, W. Zellkern und Zellzyklen. Stuttgart: Ulmer. 1976.

NIKLAS, A., OEHLERT, W. Autoradiographische Untersuchungen der Größe des Eiweißstoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. Beitr. Path. Anat. 116 (1956). 92 - 123. (vgl. auch: Acta histochem. 4 (1957). 166 -17o.)

NOLTENIUS, H., ACHENBACH, H., OEHLERT, W., SCHELLHAS, H. Experimentelle Nierenvergrößerung nach unilateraler Nephrektomie bei Ratten. Beitr. Path. Anat. 132.II. (1965). 22o - 24o.

ORLOFF, J., HANDLER, J.S. The cellular mode of action of antidiuretic hormons. Amer. J. Med. 36. (1964). 686 - 697.

PELC, S.R. Autoradiograph technique. Nature.16o (1947). 749 - 75o.

ders. The stripping film technique of autoradiography. Int. J. appl. Radiat. 1 (1956). 172 - 177.

PERRY, R.P. Quantitative autoradiography. In: PRESCOTT, D.M. (ed.). Methods in cell physiology. I. New York, London: Academic Press 3o5. 1964.

PFEIFER, U. Probleme der zellulären Autophagie. Morphologische, enzymchemische und quantitative Untersuchungen an normalen und alterierten Leberepithelien der Ratte. Ergebn. anat. Entwickl. Gesch. 44 (1971). 1 - 74.

RANDERATH, E. Die Entwickling der Lehre von den Nephrosen in der pathologischen Anatomie. Erg. allg. Path. 32 (1937). 91 - 14o.

REMMER, H. Introduction of drug metabolizing enzyme system in the liver. Eur. J. Clin. Pharmacol. 5 (1972). 116.

SAUL, G.B., GARRITY, E.B., BERNISCHKE, K., VALTIN, H. Inherited hypothalamic diabetes insipidus in the Brattleboro strain of rats. J. Hered. 59 (1968). 113 - 117.

SCHETTLER, G. Innere Medizin. I. Stuttgart: Thieme. 1976.

SCHULTZE, B. Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. Hdb. d. allg. Path. II,5. Berlin, Heidelberg: Springer. 1968. 466 - 67o.

SCHULTZE, B., OEHLERT, W., MAURER, W. Vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H, ^{14}C und ^{35}S-markierten Aminosäuren zur Größe des Eiweißstoffwechsels einzelner Gewebe Zellarten bei Maus, Ratte und Kaninchen. Beitr. path. Anat. 122 (196o). 4o6 - 431.

SIEGENTHALER, W. Klinische Pathophysiologie. Stuttgart: Thieme. 1976. 295 f.; 882 ff.

STAEMMLER, M. Die akuten Nephrosen. IV. Tubuläre Schädigung und Wiederherstellung. Virch. Arch. Path. Anat. 33o (1957). 139 - 155.

STÖCKER, E. Studien zur zellulären Eiweiß- und Nucleinsäuresynthese in normalen und durch Thioacetamid beeinflußten Leberzellen der Ratte. Autoradiographische Untersuchungen mit tritiiertem Phenylalanin, Cytidin und Thymidin. Habil. Schrift. Würzburg 1963.

ders. Autoradiographische Studien zum Einfluß von Thioacetamid auf den zellulären Eiweiß- und Nucleinsäurestoffwechsel in Leberzellen der Ratte. Beitr. path. Anat. 129 (1964). 247 - 295.

STÖCKER, E., ALTMANN, H. Die Größe des Nucleolus und die Nucleolus - Karyoplasma - Relation als Ausdruck synthetischer Aktivitäten. Z. Krebsforsch. 65 (1963). 351 - 377.

STRAUS, W. Occurence of phagosomes and phagolysosomes in different segments of the nephron in relation to the reabsorbation, transport, digestion and extrusion of intravenously injected horseradish peroxidase. J. Cell. Biol. 21 (1964). 295 - 3o8.

THOENES, W., LANGER, K.H. Die Endocytose-Phase der Eiweißresorption im proximalen Nierentubulus. Untersuchungen am Ferritin-resorbierenden Einzeltubulus der Rattenniere. Virch. Arch. Abt.B.2 (1969). 361-379.

THOENES, W., LANGER, K.H., PFEIFER, U. — Eiweißresorption, Cytoplasmaeinschmelzung und lytische Aktivitäten im Nierentubulus. Verh. dtsch. Ges. Path. 52 (1968). 294 - 299.

THOENES, W., LANGER, K.H., PFEIFER, U., ROMEN, W. — Eiweißresorptionstropfen und Lysosomen im proximalen Tubuluskonvolut der Rattenniere. Virch. Arch. Abt. B. 5 (197o). 124 - 143.

TIETZE, H.U. — Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen zur antidiuretischen Wirksamkeit von Carbamazepin (Tegretal). Habil. Schrift. Erlangen. 1973a.

ders. — Desamino-D-Arg^{8}- Vasopressin - Diacetat (DDAVP) und Carbamazepin in der Behandlung des Diabetes insipidus. Monatsschrift Kinderheilk. 121 (1973b). 496 - 498.

TIETZE, H.U., PÖPPEL, J. — Tierexperimentelle Untersuchungen zur antidiuretischen Wirksamkeit von Carbamyldibenzoazepin (Tegretal) beim Diabetes insipidus. Klin. Wschr. 51 (1973). 775 - 776.

UHLRICH, E., LOESCHKE, K., EIGLER, J. — Zur antidiuretischen Wirkung bei Carbamazepin bei Diabetes insipidus. Klin. Wochenschrift. 5o (1972). 1127 - 1133.

ULLRICH, K.J. — in: KEIDEL, W.D. Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart: Thieme. ^{3}1973. 236 - 263. 264 - 273.

ULLRICH, K.J., RUMRICH, J.G., FUCHS, G. — Wasserpermeabilität und transtubulärer Wasserfluß corticaler Nephronabschnitte bei verschiedenen Diuresezuständen. Pflügers Arch. ges. Physiol. 28o (1964). 99 - 119.

VALTIN, H. Hereditary hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain). A useful experimental model. Amer. J. Med. 42 (1967). 814 - 827.

ders. Animal model of human disease: Hereditary hypothalamic diabetes insipidus in the Brattleboro strain of rat. Am. J. Pathol. 83 (1976). 633 - 636.

VALTIN, H., SCHROEDER, H.A. Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain). Am. J. Physiol. 206 (1964). 425 - 430.

VALTIN, H., SCHROEDER, H.A., BERNISCHKE, K., SOKOL, H.W. Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats. Nature. 196 (1962). 1109 -1110.

WARNIG, A., THOENES, W. Zelluläre Blasenbildung als Ischämiefolge. Verh. dtsch. Ges. Path. 55 (1971). 640 - 645.

WEIGELT, O. Ein Rattenstoffwechselkäfig im Bauprinzip. Z. Versuchstierk. 12 (1970). 68.

ZOLLINGER, H.U. Über hyalintropfige Veränderungen der Nierenhauptstücke als Ausdruck von Eiweißspeicherung. Phasenmikroskopische Beobachtungen über Mitochondrienfunktionen II. Schweiz. Z. Path. Bakt. 13 (1950). 146 - 163.

Herrn Professor Dr. med. W.-D. Heine danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. H.-W. Altmann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf

Ich, Wilhelm Werner Apetz, wurde am 12. August 1954 als Sohn des Augenarztes Dr. Heinrich Apetz und seiner Ehefrau Anna, geb. Throm, in Würzburg geboren, wo ich auch mein bisheriges Leben verbrachte.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Steinbachtal - Volksschule in Würzburg und legte als Schüler des humanistischen Wirsberg - Gymnasiums im Sommer 1973 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich das Studium der Medizin an der Julius - Maximilians - Universität Würzburg. Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich im August 1975, den ersten und zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im März 1977 und 1979. Zur Ausbildung im Praktischen Jahr befand ich mich an der Missionsärztlichen Klinik Würzburg (Chirurgie/Innere Medizin) und der Universitätsfrauenklinik Würzburg. Im Frühjahr 1980 unterzog ich mich dem dritten Teil des Staatsexamens und erhielt am 3. Juni 1980 die Approbation als Arzt.

Seit 1. August 1980 arbeite ich als Assistent am Anatomischen Institut der Universität Würzburg.

Wilhelm Apetz

Druck: Böhler-Verlag 87 Würzburg, Seilerstr. 10-10a